طرق الكشف

عن

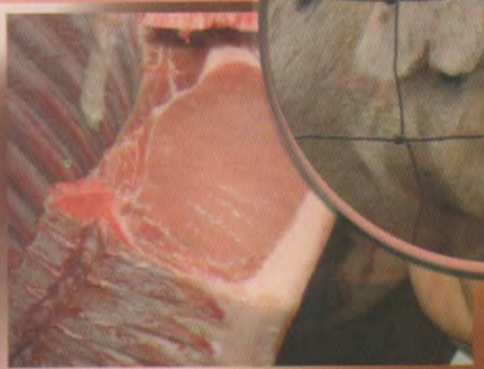
جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى الغذاء













د/ محمد محمد محمد هاشم



الدار العربية للنشر والتوزيع

طـرق الكشـف
عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى الغذاء

إعداد

د. محمد محمد محمد هاشم

أستاذ بكلية الطب البيطري جامعة القاهرة

مستشار جامعة القاهرة لشئون التغذية سابقاً

المستشار العلمي لهيئة المواصفات والمقاييس لدول مجلس التعاون لدول الخليج العربية سابقاً

خبير الصناعات الغذائية بالدار السعودية للخدمات الأستشارية سابقاً

رئيس وحدة أبحاث تجارب الحيوان بكلية الطب

جامعة الملك عبد العزيز سابقاً

عضو المجالس القومية المتخصصة

الطبعة الأولى

2008



الدار العربية للنشر والتوزيع

حقوق النشر

اسم الكتاب :طرق الكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير في الغذاء

اســم المـؤلف : أ. د/ محمد محمد محمد هاشم

رقـــم الإيداع: ٣٨٠٩ / ٢٠٠٨

الترقيم الدولي : 977-258-302-x

الطبعـــة الأولى : 2008

للدار العربية للنشر والتوزيع

32 شارع عباس العقاد - مدينة نصر

جمهورية مصر العربية - القاهرة

تليفون : 22753335

فاكس : 22753388

بسم الله الرحمن الرحيم

اهـــداء

إلى حفيدتي

حبيبة أحمد محمد هاشم

اللهم اجعلها من أهل العلم والدين

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية فى بلادنا يوماً بعد يوم. ولا شك أنه فى الغد القريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت واذلت من أبنائها وغير ابنائها. ولا ريب فى أن امتهان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافى فكرى للأمة نفسها، الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً طلاباً وطالبات، علماء ومثقفين مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغة عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت - فيما مضى- علوم الأمم الأخرى وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تنعم به أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوة العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى. فقد كانت المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة-والعرب والإغريق، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطواعة للعلوم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أقدر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع نهاية عصر الوجود التركى، ثم الاستعمار البريطانى والفرنسى مما عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لابد من أن تتغير، وأن جمودهم لابد أن تدب فيه الحياة، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء والعلماء نحو إنماء اللغة وتطويرها حتى أن مدرسة قصر العينى فى القاهرة، والجامعة الأمريكية فى بيروت

درستا الطب بالعربية أول إنشائهما. ولو تصفحنا الكتب التى أُلفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيها باللغة العربية لوجدناها كتباً ممتازة لا تقل جودة عنَ مثيلاتها من كتب الغرب فى ذلك الحين، سواء فى الطبع، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر. وفُرضت على أبناء الأمة فرضاً، إذ رأى المستعمر أن فى خنق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه، فتفننوا فى أساليب التملق له اكتساباً لمرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون فى قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر: "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة".

فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر – فى أسرع وقت ممكن – إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام والمهنى والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم. وكلنا ثقة فى إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظراً لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكيناً للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم.

ولا يغيب عن حكوماتنا العربية أن حركة التعريب تسير متباطئة، أو تكاد تتوقف بل تحارب أحياناً ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات ممن ترك الاستعمار فى نفوسهم عقُداً وأمراضاً، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم التطبيقية الحديثة إلى اللغة العبرية وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهوديًا، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى

على مناهجها الدراسية وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأناً من غيرها ؟!.

وأخيراً .. وتماشياً مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقاً لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى باللغة العربية، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقة إلى رحاب لغتنا الشريفة تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المتميز الذى يعتبر واحداً من ضمن ما نشرته - وستقوم بنشرة - الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة.

وبهذا ... ننفذ عهداً قطعناه على المضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحى وفيما أراده الله تعالى لنا من جهاد فيها.

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابة الكريم ﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُمْ بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ (106) ﴾ " سورة التوبة الآية "

محمد أحمد دربالة
الدار العربية للنشر والتوزيع

مقــدمة

هذه النشـرة تبرز بعض طرق الكـشف عن جيلاتين ولحوم ودهـون الخنزير فى المنتجات الـغذائية. وتعتبر مرجعًا علـميًا تطبيقيًا جديدًا وبها إضـافات علمية حديثة تـفتقر إليهـا المكتبات العـربية والتى تفـيد فى التطبـيق العلمى والـعملى للأطباء البيطريين والمتخصصين.

وانطلاقًا من تحريم الديـن الإسلامى الحنيف لأكل لحم الخنزيـر ومنتجاته، كانت فكرة نـشر هذه النشرات العلميـة التى تـساهم فى الكشـف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية.

كما أن هيئات المواصفات والمقاييس الإسـلامية والعربية والعالمية أولت هذا الموضوع اهتمـامًا كبيرًا فى إيجاد الطرق المخـتلفة للكشف عـن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية وذلـك لحماية المستهلك من خطر الأمراض المختلفة التـى تنتقل إليه من منتـجات الخنزير، ولهذا السـبب تـبرز أهمية وضع بعض الطرق والأبـحاث العلمية المختـلفة للكشف عن جـيلاتين ولحوم ودهون الخنزير والتى نوردها كما ذكرها مؤلفوها حتـى نترك الفرصة لكل مختبر باختيار الطريقة التى تناسـبه تبعًا لإمكانياته ونرجو من الله سبحانه وتـعالى أن يوفقنا لما فيه الخير لحـماية المستهلك مـن لحوم الخنزير ومنتجـاته تبعًا للشريعـة الإسلامية السمحاء.

ونحن نعلم بأن أى عـمل علمى لا يبلغ الكمال ولهذا برحـابة صدر نتقبل مـن جميـع المهتمين فـى هذا المجال النـقـد العلمى الموضـوعى أو أى إضافة

أو تعليق حول محتــويات هذه النشرة لكى نستفيد منها فــى الطبعات القادمة إن شاء الله .

وأسأل الله عز وجل أن تــكون هذه النشرة علــم ينتفع به لوجــه الله تعالى وصلى الله على سيدنا محمد وعلى آله وصحبه وسلم .

المؤلف

الفصل الأول

أدلة تحريم لحوم الخنزير ومنتجاته فى الإسلام

فى القرآن الكريم:

١ - يقول الله تبارك وتعالى: ﴿يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا كُلُوا مِن طَيِّبَاتِ مَا رَزَقْنَاكُمْ وَاشْكُرُوا لِلَّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ (١٧٢) إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ بِهِ لِغَيْرِ اللَّهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلا عَادٍ فَلا إِثْمَ عَلَيْهِ إِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ (١٧٣)﴾ [البقرة: ١٧٢ ، ١٧٣].

٢ - ويقول سبحانه وتعالى: ﴿حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ وَالدَّمُ وَلَحْمُ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ وَالْمُنْخَنِقَةُ وَالْمَوْقُوذَةُ وَالْمُتَرَدِّيَةُ وَالنَّطِيحَةُ وَمَا أَكَلَ السَّبُعُ إِلاَّ مَا ذَكَّيْتُمْ وَمَا ذُبِحَ عَلَى النُّصُبِ وَأَن تَسْتَقْسِمُوا بِالأَزْلامِ ذَلِكُمْ فِسْقٌ الْيَوْمَ يَئِسَ الَّذِينَ كَفَرُوا مِن دِينِكُمْ فَلا تَخْشَوْهُمْ وَاخْشَوْنِ الْيَوْمَ أَكْمَلْتُ لَكُمْ دِينَكُمْ وَأَتْمَمْتُ عَلَيْكُمْ نِعْمَتِي وَرَضِيتُ لَكُمُ الإِسْلامَ دِينًا فَمَنِ اضْطُرَّ فِي مَخْمَصَةٍ غَيْرَ مُتَجَانِفٍ لِّإِثْمٍ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [المائدة: ٣].

٣ - يقول جل وعلا: ﴿قُل لاَّ أَجِدُ فِي مَا أُوحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّمًا عَلَىٰ طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلاَّ أَن يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَمًا مَّسْفُوحًا أَوْ لَحْمَ خِنزِيرٍ فَإِنَّهُ رِجْسٌ أَوْ فِسْقًا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلا عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [الانعام: ١٤٥].

٤ - ويقول تعالى: ﴿فَكُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلالاً طَيِّبًا وَاشْكُرُوا نِعْمَتَ اللَّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ (١١٤) إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلا عَادٍ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ (١١٥)﴾ [النحل: ١١٤ ، ١١٥].

(*) الأمراض التى تنتقل من الخنازير ومنتجاتها إلى الإنسان يمكن الاطلاع عليها فى كتاب الأمراض التى تنتقل من الحيوانات ومنتجاتها إلى الإنسان وطرق الوقاية منها للدكتور محمد محمد هاشم - دار المعارف ٢٠٠٠ م.

الفصل الثانى

الكشف عن جيلاتين الخنزير في المنتجات الغذائية

استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفرومة وتقديرها بالامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى (اليسا)

Extraction of staphylococal Entèrotoxins (SE) From Minced Meat and Subsequent Detection of SE With Enzyme - Linked immunosorbent Assay (ELISA)

S. NOTERMANS; R. Boot, P. D. 71PS AND M.P.DENOOIJ, J of Food preotection, vo. 46. No:3, pages 238-2241 (1983)

الفصل الثانى

الكشف عن جيلاتين الخنزير فى المنتجات الغذائية

استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفرومة وتقدير ها بالامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى (اليسا)

أساس الطريقة:

تعتمد هذه الطريقة على استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفـرومة وتـعيـينـها بطـريقـة الامتـصاص المنـاعى بـالارتبـاط الانزيمـى وهى استافيلوكوكس انتروتوكسين A ، B ، C ، E ، (SEA، SEB، SEC، SEE) الموجودة فى اللحوم المفرومة (٥٠٪ لحوم بقر، ٥٠٪ لحوم خنزير).

لحوم مفرومة غيـر معاملة حراريا نستخـلص العينة بكمية مـتساوية من الماء المـقطر عنـد أس هيدروجيـنى ٤,٥ ومـن ثم يركز المـستخلـص إلى (10 fold) ويضبـط الأس الهـيدروجيـنى عـند ٧,٢ وهـذا كافـى لتعـين أقـل من ٠,٥ ميكروجرام من SE/ ١٠٠ جرام من المنتج. طريقـة الاستخلاص تغطى ٤٠ - ٨٠٪ من التوكسين وتـستخدم طريقة اليسا ولـم تلاحظ نتيجة إيجابيـة أو سلبية زائفة .

وباستخدام الطريقة السابقة فى استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المـفرومة المعاملـة حراريًا وجدت أنها منـخفضة (0.14 FOR SEB) . ويحضر مستخلص مركبات أخرى بالمعـاملة الحرارية ومنها الجيلاتين الموجود فى اللحوم المفرومة التى تسبب عدم التفاعل المناعى على SEB، SEC، SEE أثناء التسخين .

اختبار تغذية القرد (Monky - feeding tests) تأتى لتوضيح عدم التفاعل المناعى للاستافيلوكوكس إنتروتوكسين B فى الجيلاتين٪ بالمعاملة الحرارية والمرافقة بعدم التفاعل البيولوجى.

الطريقة والمواد

- **اللحوم المفرومة:**

تحضر اللحوم المفرومة من البقالة والتى تحتوى على ٥٠٪ لحوم بقرية، ٥٠٪ لحوم خنزير مفرومة والدهون الموجودة باللحم المفروم حوالى ٣٠٪ .

- **استافيلوكوكس انتروتوكسين:**

استافيلوكوكس انتروتوكسين A ، B ، C ، E تحضر من ميكروب استافيلوكوكس أوريس ٧٢٢، ١٤٤٥٨، ١٣٧ ، ٣٢٦ E على التوالى كما شرحها Shinagawa وآخرون وتنقى باستخدام عديد من الكروماتوجرافات.

- **حقن اللحوم المفرومة باستافيلوكوكس انتروتوكسين:**

تذاب كمية من الاستافيلوكوكس انتروتوكسين فى ٠,٠٧ من محلول متعادل إم فوسفات الأس الهيدروچينى ٧,٢ محتوى على ٠,١٥ إم صوديوم كلوريد يتفاوت من ٣ - ٥٠٠٠ نانوجرام/ جرام تضاف إلى اللحوم المفرومة لمدة ٢٤ ساعة قبل الاستخلاص. اللحوم المفرومة تخزن أثناء هذه الفترة عند درجة حرارة ٤° س.

تجرى التجارب بواسطة (أ) استافيلوكوكس انتروتوكسين مضافا إليها اللحوم المفرومة وغير المعاملة حراريا، (ب) اللحوم المفرومة المعاملة حراريا المضافة إلى استافيلوكس انتروتوكسين والتى تضاف بعد التسخين، (ج) والمضاف إليها استافيلوكوكس انتروتوكسين إلى اللحوم المفرومة المعاملة حراريًا.

طرق الاستخلاص:

الطرق المختلفة للاستخلاص والمختبرة هى:

١- تجنيس اللحوم المفرومة المراد الاستخلاص منها فى جهاز التجنيس مضافًا إليها كمية متساوية من الماء المقطر.

٢- يضبط الأس الهيدروجينى للحوم المخلوطة عند ٤,٥ مستخدمًا ١ إن كلوريد الصوديوم أو عند اس هيدروجينى ٧,٢ مستخدمًا ١ إن صوديوم هيدروكسيد.

٣- تدور اللحوم المفرومة فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة عند درجة حرارة ٥° س لمدة ١٥ دقيقة.

٤- يزال الدهن المتجمد والسائل الطافى (١٠٠ ملل) يضبط أسه الهيدروجينى عند ٧,٢ مستخدمًا ١ إن صوديوم هيدروكسيد.

٤- المستخلص يعالج إما بالكلوروفورم أو بالتسخين فى حمام مائى يغلى لمدة ٥ دقائق أو لا يعالج.

٥- إذا وجد ترسيب المستخلص يدور فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة.

٦- المستخلصات المعالجة أو غير المعالجة تديلز ضد محلول بولى ايثلين جليكول (v/w ٪ PEG).

٧- يوضع المستخلص فى أنابيب الديلزه.

طريقة عمل اليسا:

تعيين الاستافيلوكوكس انتروتوكسين بطريقة اليسا فى صورة ساندوتش

والمشروحة بواسطة العالم Buhning - pfone وآخرون. الحفر فى أطباق من بولى سترين polystyrene والتى يوضع فيها مضاد للاستافيلوكوكس انتروتوكسين IgG من الأغنام (١, ٠ ملل من المضاد SE-IgG يخفف فى ٠٧, ٠ إم من محلول محايد الفوسفات عند اس هيدروجينى ٧,٢ يحتوى على ١٥, ٠إم كلوريد صوديوم (PBS) تضاف لكل حفرة وتحضن طول الليل مع الهز عند درجة حرارة ٢٠° س، . بعد التحضين تغسل الأطباق بماء جارى من الصنبور والمحتوى على ٠٥, ٠ ٪ توين (Tween) لمدة نصف دقيقة بعد تغطية الحفر العينات المختبرة تحضن (١, ٠ ملل من العينة، مخففة أو غير مخففة بواسطة PBS والمحتوى على ٠٥, ٠ توين ٢٠) والمضافة لكل حفرة.

بعد التحضين لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٢٠° س (بعض التجارب تحضن عند درجة حرارة ٤٠س – انظر إلى النتائج) مع الهز.

تغسل الأطباق كما شرحت سابقًا، الكمية الممتصة من الاستافيلوكوكس انتروتوكسين (SE) تقاس باستخدام مضاد SE-IgG يتحد مع بيروكسيديز (peroxidase) ١, ٠ من المحلول المتحد المخفف فى PBS محتويا على ٠٥, ٠ توين ٢٠ يضاف إلى الحفر.

تحضن وتغسل كما شرحت سابقًا ويعين التفاعل الانزيمى بواسطة جهاز الإسبكتوفوتومتر عند ٤٥٠ نانومتر بعد إضافة محلول من ٥ – أمينو – حامض السلسليك، ماء الأكسجين (H_2O_2) (١٥, ٠ ملل من ٠٧, ٠ ٪ من ٥ – أمينو – حامض السلسليك عند أس هيدروجينى ٦ محتويا على ٠٠٥, ٠ ٪ ماء أكسجين تضاف H_2O_2 لكل حفرة.

بعد التحضين لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٢٠° س، يقاس امتصاص الضوء).

الـIgG المركز يستخدم كغلاف، IgG بيروكسيديز المرتبط (conjugate) والمتركز يقدر بواسطة جهاز Chekarboard titration.

اختبار تغذية القرود The monky feeding trst:

اختبار النشاط البيولوجى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين B، تعطى القرود زنة ٢,٥ كجم بواسطة أنبوب يدخل عن طريق الأنف إلى المعدة التوكسين (جدول ٤) أثناء فترة الاختبار يختبر مصل القرود لوجود الأجسام المضادة للاستافيلوكوكس انتروتوكسين B مستخدمًا طريقة اليسا. فى هذا التكنيك الاستافيلولوكوكس انتروتوكسين تغلف أطباق البولى استرين بعد تحضين أمصال القرود المخففة والكمية المتصة للأجسام المضادة تقاس باستخدام مضادات إمينوجلوبينات القرود المرتبطة إلى البيروكسيديز.

النتائج:

- **تعيين الاستافيلوكوكس انتروتوكسين فى اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريا والمستخلصات المختلفة المنتجة للاختبار، التجربة القادمة تعطى قناعة بالنتائج:**

١- يجنس ١٠٠ جرام من اللحوم المفرومة مع ١٠٠ ملل من الماء المقطر.

٢- يضبط الأس الهيدروجينى عند ٤,٥.

٣- تدور فى جهاز الطرد المركزى عند درجة حرارة منخفضة ٥° س.

٤- يركز المحلول الطافى عند ٧,٢.

٥- يركز المحلول الطافى Ten fold مستخدمًا PEG.

٦- اللحوم المفرومة المجنسة يضبط الأس الهيدروجينى لها عند ٤,٥ والناتج عنها مستخلص أقل بروتينات ويسهل تركيزه.

٨- تدور اللحوم المجنسة عند درجة حرارة منخفضة ينتج عنها طبقة جافة من الدهن والتى يجب أن تزال.

٩- يعاد ضبط الأس الهيدروچينى للمستخلص عند ٧,٢ والذى لا يسمح بالترسيب ويتجنب أساسًا تفاعلات خاصة فى طريقة اليسا. لا يوجد تداخل بالبروتينات سواء عند اختبار المحلول الطافى أو المركز بواسطة اليسا.

١٠- تعيين الاستافيلوكوكس انتروتوكسين بواسطة اليسا مستخدمًا السائل المستخلص أو المركز المساوى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين النقى بواسطة PBS المخفف.

١١- نتيجة الاستخلاص موجودة فى جدول رقم (١) (اطلع على اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريًا). كمية الاستافيلوكوكس إنتروتوكسين فى مجمل المستخلصات المختلفة من ٤٠ - ٨٠٪ من الكمية الأصلية التى أضيفت للحوم المفرومة، هذه النتائج تدل على أن الإستافيلوكوكس انتروتوكسين منتشرًا بالتساوى بين الطور المائى والطور الجاف للحوم المفرومة المتجانسة. زيادة على ذلك يوجد علاقة مباشرة بين كمية الاستافيلوكوكس انتروتوكسين المستخلصة وكمية الاستافيلوكوكس انتروتوكسين مضافة إلى العينة الأصلية.

١٢- تركيز المستخلص Ten-fold مستخدمًا PEG ينتج عنه زيادة فى تركيز التوكسين. زيادة التركيز تقريبًا من ٥ - ٨ مرات (جدول ١).

١٣- علاج المستخلص بالكلوروفورم يؤدى إلى ارتفاع قيمة البلانك Blank فى اختبار اليسا عند طول موجة ٤٥٠ نانومتر علاوة على ذلك مستخلص الاستافيلوكوكس انتروتوكسين الموجود فى الكلوروفورم المركز تعيينه غير دقيق.

١٤- يسخن المستخلص الناتج من النتائج السالبة من SEB، بينما المستخلص من SEA، SEC، SEE شرحت.

١٥- تركيز المستخلص المعالج الناتج فى المنتج عالى الجيلاتين والذى يذوب عند درجات حرارة أعلا من ٣٧° س.

★ تعيين إستافيلوكوكس انتروتوكسين غير المعاملة حراريا فى اللحوم المفرومة المعاملة حراريا

فى هذه التجارب، اللحوم المفرومة تسخن حتى ١٠٠° س لمدة ٢٠ دقيقة بعد إضافة الاستافيلوكوكس انتروتوكسين.

استخدام طريقة الاستخلاص SE وتطبيقها على اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريًا تقريبًا تعادل المتحصل عليها من اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريا (نتائج لم ترى). تركيز المستخلص بالديلزة ضد PEG الناتج فى المستخلص الصلب الذى يذوب عند درجة ٣٧° س أو أقل تقريبًا. إذا كان اختبار اليسا تم عند درجة حرارة ٤٠° س، لا يفقد الحساسية المتحصل عليها.

★ تعيين إستافيلوكوكس انتروتوكسين بعد المعاملة حراريا فى اللحوم المفرومة:

١- تضاف استافيلوكوكس انتروتوكسين إلى اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريا.

٢- الخليط يسخن حتى درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ٢٠ دقيقة .

٣- تستخدم طريقة الاستخلاص كما شرحت سابقًا.

٤- عودة بسيطة للاستافيلوكوكس انتروتوكسين المتحصل عليها (جدول ١ تحت SE بعد تسخين اللحوم المفرومة.

٥- إنتاج SEA، SEB منخفض.

٦- كميات SEA، SEB، SEC، SEE الموجودة فى المستخلص هى أكبر من ٦,٠ ٪ ، ١٤,٠ ٪ ، ٣,٤ ٪ ، ١٧ ٪ تقريبًا على التوالى من الكمية المضافة من الأصل إلى ١٠٠ جرام لحوم مفرومة.

سكون مناعة استافيلوكوكس انتروتوكسين فى اللحوم المفرومة بالحرارة:

عودة منخفضة للاستافيلوكوكس انتروتوكسين بعد تسخين اللحوم المفرومة قد تكون بسبب تعديل مناعة الاستافيلوكوكس انتروتوكسين.

فى هذا الاختبار ممكن أن تختلف كميات SE المضافة إلى واحد ملل من مستخلصات اللحوم المفرومة المعاملة حراريًا من أجل هذا الغرض المستخلص يركز 10-fold باستخدام PEG. فقد النشاط المناعى أثناء التسخين عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق تقدر باستخدام اليسا. ومن أجل ذلك المعاملة الحرارية للحوم المفرومة سابقًا لا تترسب مرة أخرى عند إعادة تسخين المركز.

من هذه النتائج يأتى وضوح عدم نشاط SEB إلى حد ما (جدول ٢)، SEA، SEC، SEE أيضًا غير نشطة عند تركيزها، ولكن مقارنتها بعدم نشاطها فى PBS تشاهد عدم نشاط التوكسينات قليلاً.

تأثير الجيلاتين على النشاط المناعى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين

تعيين مركزات اللحوم المفرومة معاملة حراريا عالية الجيلاتين، تأثير الجيلاتين والحرارة على النشاط المناعى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين. PES يحتوى على كميات مختلفة من الجيلاتين وعوملت حراريا حتى ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق ويقدر النشاط المناعى باستخدام طريقة اليسا.

النتائج (جدول ٣) تبين أن هناك فقدان للنشاط المناعى تقريبًا ٥٠ ٪ من SE المعاملة حراريًا عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق فى PBS بدون جيلاتين. فقليلا (عمليا) لا تشاهد إضافات تفقد النشاط المناعى للاستربتوكوكس انتيروتوكسين بزيادة كمية الجيلاتين، بينما SEB، SEC، SEE تفقد نشاطها بزيادة كميات الجيلاتين SEB تفقد معظم نشاطها سريعًا ويتبعها على التوالى SEC، SEE.

محلول ١-٢ ٪ من ناتج الجيلاتين يفقد نشاطه المناعى بالمقارنة لفقد النشاط المناعى للـ SEB، SEC، SEE بالتسخين فى اللحوم المفرومة.

التأثير البيولوجى للاستربتوكوكس انيتروتوكسين:

ملاحظة عدم النشاط المناعى فى تجارب SEB ترافق بُعد النشاط البيولوجى، التجارب المغذاه Feeding tests التى تجرى على قرد واحد (جدول ١). كمية من ١٠ ميكروجرام من SEB المعامل حراريا فى PBS عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق بالنشاط المناعى من ٢,٥ ميكروجرام للاستربتوكوكس إنتيروتوكسين B تسبب قئ للقرد.

نفس الكمية من SEB المعاملة حراريا فى الجيلاتين نتج عنها انخفاض فى النشاط المناعى ولا تشاهد أعراض بيولوجية، حتى جزء من ٢٠٠ ميكروجرام من SEB المعامل حراريا فى الجيلاتين لا ينتج عنها قيء فى القرد من اختبار القرد أقل حساسية للـSEB عند نهاية التجارب على القرد المغذى على ١٠ ميكروجرام من SEB غير المعامل حراريا يقيء القرد بعد ساعتين من إعطاء التوكسين.

الآن الأعراض تكون شديدة أكثر من بعد إعطاء ١٠ ميكروجرام من SEB

المعامل حراريا. أثناء المدة كلها للاختبارات القرد لم تتكون عنده أجسام مضادة ضد SEB وتم تعيين ذلك بطريقة اليسا.

جدول (١)

يبين استافيلوكوكس انتروتوكسين (SE) فى مستخلصات وتركيزات من لحوم مفرومة غير معاملة حراريا وبعد المعاملة حراريا فى اللحوم المفرومة

نوع وكمية المضافة إلى اللحوم المفرومة (نانوجرام مم)		كمية المعينة (نانوجرام/ ملل)			
		فى اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريًا		بعد المعاملة حراريا للحوم المفرومة	
		المستخلص (*)	التركيز (**)	المستخلص (*)	التركيز (**)
SEA	١٠	١٢	٧٠	غير مختبرة	غير مختبرة
	١٠٠	٧٨	٧٥٠	أكبر من ٣	أكبر من ٣
	٥٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	أكبر من ٣	٥
SEB	٣	أكبر من ٢	٨	غير مختبرة	غير مختبرة
	١١	٦	٣٥	غير مختبرة	غير مختبرة
	٣٣	١٧	٩٠	غير مختبرة	أكبر من ٢
	١٠٠	٤٠	غير مختبرة	أكبر من ٢	أكبر من ٢
	٥٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	أكبر من ٢	٦
	٥٠٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	٧	٥٠
SEC	٣	أكبر من ٢	٩	غير مختبرة	غير مختبرة
	١١	٧	٤٠	غير مختبرة	أكبر من ٢
	٣٣	٢٣	١٧٠	أكبر من ٢	٧
	١٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	٣	١٨
	٥٠٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	١٧٠	غير مختبرة
SEE	٣	أكبر من ٢	٨	غير مختبرة	غير مختبرة
	١١	٨	٥٠	أكبر من ٢	١١
	٣٣	١٦	٨٨	٦	٢٨
	١٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	١٧	٩٠
	٥٠٠٠	غير مختبرة	غير مختبرة	٨٥٠	غير مختبرة

(*) ١٠٠ جرام لحوم مفرومة استخلصت بواسطة ١٠٠ ملل ماء مقطر عند ١ س هيدروجينى ٤,٥.

(**) المستخلص (١٠٠ ملل) ركز 10-fold مستخدما PEG.

جدول (٢)

يبين فقد النشاط المناعى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين (SE) بعد المعاملة حراريا (١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق) فى تركيز المستخلص للحوم المفرومة المعاملة حراريًا وفىPBS

نوع التوكسين	فقد النشاط المناعى(*) فى	
	المستخلص المركز	PBS%
SEA	٦٣	٦٣
SEB	أقل من ٩٩,٥	أقل من ٩٩,٥
SEC	٧٩	٧٩
SEE	٧٠	٧٠

(*) النشاط المناعى محسوب من المنحنى القياسى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين المخفف إما فى المستخلص المركز أو فى PBS

جدول (٣)

يبين فقد النشاط المناعى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين (SE) بعد المعاملة الحرارية (١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق) فى PBS المحتوى على زيادة كمية الجيلاتين

كمية الجيلاتين (%w/v)	المعاملة الحرارية	فقد الناط المناعى(*)	
		SEB SEA	SEE SEC
صفر	لا يوجد	صفر٪	صفر٪
صفر	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٤٥٪	٦٠٪
٠,١	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٤٥٪	٩٢٪
٠,٣	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٤٥٪	٩٤٪
١	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٥٠٪	٩٨٪
٣	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٥٧٪	أقل من ٩٩,٥٪
١٠	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٦٠٪	أقل من ٩٩,٥٪

(*) النشاط المناعى حسب من المنحنى القياسى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين المخفف فى PBS

جدول (٤)

النشاط المناعى والبيولوجى للاستافيلوكوكس انتروتوكسين B (SEB) المعامل حراريًا فى الجيلاتين (10% w/v) عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق

إجمالى كمية SEB المستعملة (ميكروجرام)	الوسيط Medium	المعاملة الحرارية	إجمالى النشاط المناعى فى الميكروجرام	رد الفعل على الفرد
٢	PBS	١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق	٠,٥	لا يوجد
١٠	PBS	١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق	٢,٥	قىء
١٠	جيلاتين (10%w/v)	١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق	٠,٠١	لا يوجد
٥٠	جيلاتين (10%w/v)	١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق	٠,٠٤	لا يوجد
٢٠٠	جيلاتين (10%w/v)	١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق	٠,١٠	لا يوجد
١٠	PBS	غير معاملة حراريا	١٠	قىء

المناقشة:

الغذاء الملوث بالاستافيلوكوكس أوريس قبل أو بعد المعاملة الحرارية. طرق المستخلصات تختبر بواسطة استخدام:

أ - الغذاء غير المعامل حراريا المحتوى على الاستافيلوكوكس انتروتوكسين.

ب- الغذاء المحتوى على SE بعد التسخين.

جـ - الغذاء المحتوى على SE المعامل حراريًا من مستخلصات مختلفة بطرق مختبرة، واضح أن اللحوم المفرومة غير المعاملة حراريا واللحوم المفرومة المعاملة حراريا مضاف إليها SE بعد التسخين. المستخلص البسيط بالماء المقطر يعطى نتائج مقنعة. نتائج مشابهة تم الحصول عليها بواسطة العالمان Buning - Pfaue atal الذين قاموا باختبار فانيليا كاسترد.

مستخلص SE بعد المعاملة الحرارية للحوم المفرومة، مستخدما ماء مقطر، يعطى نتائج أقل اقتناعًا وعلى سبيل المثال SEB تغطى فقط ١٤ ,٠ ٪ (جدول ١). أقل تغطية قد تحدث بتغطية SE فى اللحوم (منشأ الجيلاتين) أو المناعة غير النشطة للتوكسين. اللحوم المفرومة المحتوية على كمية من الأنسجة الضامة والمواد الغضروفية. بناءًا عليه وجود كلاجين. نتائج تسخين الكلاجين فى نسيج البروتين الذى قد يكون مغلف للتوكسين. إذا كان SE مرتبط باللحوم المفرومة والمخلوطة بالماء المقطر يجوز إزالتها بالترسيب المتحصل بعد تدويرها فى جهاز الطرد المركزى المخلوط. . بينما SEB بفقد قليلاً من النشاط المناعى كذلك بعد التسخين فى المستخلصات المركزة للحوم المفرومة والمعاملة حرارية. يظهر بوضوح أن الجيلاتين فى اللحوم المفرومة على الأقل واحد من المواد مسئول عن تثبيط نشاط SEB، SEC، SEE بتسخين اللحوم المفرومة متساويا مع تثبيط الحرارة لبعض التوكسينات فى PBS والمحتوى على ١ - ٢ ٪ جيلاتين. يسلم بأن التثبيط المناعى لثلاث أنواع من التوكسين فى اللحوم المفرومة توجد إلى حد كبير بالجيلاتين. هذه تعرف بأن المعاملة الحرارية SE الموجودة فى البروتينات قد تسرع فى تثبيط النشاط للـSE•العالمان Stterlee وkraft وجدوا أن التسخين للـSEB فى وجود الميوسين أو متميوجلوبين ينتج عنه فقد سريع للنشاط المناعى للتوكسين. باختبار تغذية القرد يأتى بوضوح التثبيط المناعى للـSE فى الجيلاتين مترافق مع التثبيط البيولوجى.

هذا يدل على أن الاختبارات لكل من SEB، SEC، SEE المعاملة حراريًا فى اللحوم المفرومة لا تبرهن على أن على الاحتياج لطريقة الاستخلاص .SEA غير نشط بالتسخين فى المستخلصات المركزة للحوم المفرومة. لا يمكن عزل SEA المرتبط باللحوم المفرومة والتى قد تزال بالترسيب المتحصل عليها بعد التدوير فى جهاز الطرد المركزى لمزج الخليط.

الاستافيلوكوكس انتروتوكسين تحتاج إلى أبحاث حول نشاطها البيولوجى بعد التسخين فى اللحوم المفرومة.

فى هذه الدراسة أقل كمية للاستافيلوكوكس انتروتوكسين توجد فى اللحوم المفرومة لم يمكن تعيينها. حساسية طريقة اليسا تعتمد على الكيف لـ IgG المستخدم للمادة الخاضعة للتفاعل الانزيمى وكذلك عوامل أخرى.

هذه الدراسة تدل على أن البروتين الموجود فى كل من المستخلصات وترسيب للحوم المفرومة ومحتويا على الجيلاتين هذا لا يتداخل فى طريقة اليسا.

هذه البراهين تدل على أن حساسية طريقة اليسا تعتمد على كمية للأجسام المضادة المستخدمة.

المراجع الأجنبية:

1- Bergdoll, M. S. 1970. Enterotoxins. pp. 265-326 *in* T. C. Montic, S. Kadis and S. J. Ajl (ed.), Microbial toxins, Vol. 3. Academic Press, New York.

2- Buning-Pfaue, H., P. Timmermans, and S. Notermans. 1980. Einfache Methode fur den Nachweis von Staphytokokken-Enteroxin in Vanillepudding mittels ELISA.Test. Lebensm. Unters. Fonch 173: 351-355.

3- Cassman. E. P., R. W. Bennet. A. E. Dorsey, and J. E. Stone 1969. The microslide double gel diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. Health Lab. Sci. 6:185-198 con't. p. 244.

4- Hauschild, A. H. W., and R. Hilsheimer. 1980. Incidence of *Clostridium botulnum* in commercial bacon. J. Food Prof. 43:564-565.

5- Hauschild, A. H. W., R. Hilsheimer, G. Jarvis, and D. P. Raymond. 1982. Contribution of nitrite to the control of *Clostridum botuhum* in liver sausage. J. Food Prot. 45:500-506.

6- Inslata. N. F., S. J. Witzeman, G. J. Fredericks, and F. C. A. Sunga, 1979. Incidence study of spores of *Clostridium botulinum* in convenicnce foods. Appl. Microbiol. 17:542-544.

7- Keyman, A., and Z. Evenchik, 1969. Activation, pp. 359-396. *In* G. W. Gould and A. Hurst (eds.) The bacterial spore. Academic Press, New York.

8- Mises, R. V. 1942. On the current use of Bayes formula. Ann. Math. Stat. 13:156-165.

9- Ntional Research Council, Committee on Nitrite and Alternative Curing Agents in Food. 1981. The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Part. 1. National Academy Press, Washington, DC.

10- Roberts, T. A., and J. L. Smart. 1977. The occurrence of clostridia, particularly *Clostridium botulinum*. in bacon and pork. pp. 911-915. *In* A. N. Barker, J. Wolf, D. J. Ellar, G. J. Dring and G. W. Gould (eds.) Spore research 1976. vol. II. Academic Press, New York.

11- Stumbo, C. R. 1973. Thermobacteriology in food processing, 2nd ed. Academic Press, New York.

12. Taclindo, C., T. Midura. G. S. Nygaard. and H. L. Bodily. 1967. Examination of prepared foods in plastic packages for *Clostridium botulinum*. Appl. Microbiol. 15:426-430.

الفصل الثالث

الكشف عن لحوم الخنزير ومنتجاته
فى المنتجات الغذائية

الكشف عن لحوم الخنزير ومنتجاته
فى المنتجات الغذائية بطريقة كورتكس المطورة(*)

قام فريق العمل بمختبر الهيئة العربية السعودية للمواصفات والمقاييس منذ عام ١٤١٤ هـ بتخطيط وتنفيذ عدد ٤ مخططات للكشف عن كفاءة مجموعات الكشف شملت اختبار عدد ١١٧ عينة يمكن تقسيمه إلى المجموعات التالية : (المسلسل من رقم ١ إلى رقم ٤ تم الكشف عليها طبقاً لطريقة الشركة بالضبط.

١ - أنواع مختلفة من اللحوم الشائعة النقية من آثار لحم الخنزير (بقر - غنم - جمل - دجاج - أرنب - سمك) وكذلك فول الصويا كمنتج يضاف إلى اللحم المفروم وذلك لتحديد إمكانية ظهور تفاعلات ثانوية مضللة من هذه البروتينات .

٢ - تركيزات متدرجة من لحم الخنزير فى لحم بقر حتى تركيز واحد فى العشرة آلاف كذلك نفس التركيزات ولكن من شحم الخنزير الخام فى لحوم الأبقار أو من خليط من شحم ولحم الخنزير مع لحم البقر وذلك لتحديد مدى حساسية المجموعات لأقل تركيز ممكن الكشف عنه بتطبيق طريقة الشركة بالضبط .

٣ - بعض عينات منتجات اللحوم السابق الكشف عنها بمعرفة الهيئة من حوالى ثلاثة سنوات وجد فى حينها احتمال وجود آثار لحم خنزير بها وتم الاحتفاظ بها لإجراء مثل هذه الاختبارات كأمثلة للتلوث .

(*) معد هذه النشرة رئيس أعضاء فريق العمل على التطوير الذى استكمل العمل بعد مغادرة أ. د. محمد إبرهيم السعداوى لهيئة المواصفات والمقاييس السعودية.

٤ - عينات لمنتجات اللحوم المستوردة تم سحبها من السوق ومن محلات الوجبات السريعة بمعرفة بعض أعضاء فريق العمل وذلك لمعرفة مدى ملائمتها للعمل الروتينى .

٥ - الطريقة التى أوردتها الشركة تتلخص فى استخلاص أهم عينه باستخدم ٩ مل محلول كلوريد صوديوم ٩,٠ ٪ ثم يؤخذ من المستخلص ١,٠ مل يضاف إليها ٩,٠ مل محلول تخفيف (ضمن مكونات المجموعة) ويؤخذ من المحلول المخفف ١,٠ مل توضع فى حفره من حفر الـ Microplate السابق تغطيتها بالأجسام المضادة للحم الخنزير ويتم التحضين لمدة ساعة مع الهز ثم الغسيل الأولى ٥ مرات ثم يضاف محلول آخر من الأجسام المضادة المرتبطة بإنزيم خاص ويحضن مع الهز لمدة ١٠ دقائق ثم الغسيل الثانى ٥ مرت بعدها يضاف مادة التفاعل يحضن مع الهز لمدة ٢٠ دقيقة حيث يظهر لون أزرق فى الحفر التى اختبر بها عينات ملوثة بلحم الخنزير وفى النهاية يضاف محلول إيقاف التفاعل الذى يحول اللون الأزرق إلى أصفر يتم قياس شدة أمتصاص بجهاز Microplate reader .

٦ - من الواضح أن طريقة الشركة المشار إليها فى البند السابق يتم فيها تخفيف العينة بدرجة كبيرة مما يؤدى إلى إفلات تركيزات آثار لحم الخنزير المنخفضة من الظهور إن وجدت وعليه فقد أجرت الهيئة بعض التعديلات على هذه الطريقة لزيادة كفاءتها بتقليل هذه التخفيفات وزيادة معدل استخلاص العينة ورفع قيم الامتصاص للعينات الملوثة وخاصة الملوثة بتركيزات بسيطة جداً وتتلخص هذه التعديلات فى استخلاص ١٠ جم من العينة باستخدام ٥ مل محلول استخلاص (مكون من ٥٠٠ مل ٩,٠ ٪ منظم فوسفات رقمه الأيدروچينى ٦,٩ + ٤٠٠ مل محلول كلوريد صوديوم + ١٠٠ مل كحول إيثايل) فى استخلاص مركزياً وأخذ ١,٠ مل من الرائق مباشرة فى

حفرة الـ Microplate كذلك زيادة مرات الغسيل الأولى-إلى ٨ مرات وزيادة فترة تحضين مادة التفاعل إلى نصف ساعة .

وقد قام فريق العمل بتنفيذ هذا التعديل على بعض العينات التى تحتوى على تركيزات متدرجة من لحم الخنزير فى لحم بقر حتى تركيز واحد فى المليون. كذلك اختبر فريق العمل نفس العينات باتباع نفس تعديل الهيئة ولكن استبدل محلول الاستخلاص الذى استنبطته الهيئة بمحلول كلوريد الصوديوم ٩, ٠ ٪ المستخدم فى طريقة الشركة .

قام فريق العمل باختبار عينات بها تركيزات متدرجة من لحم الخنزير فى لحم بقر حتى تركيز فى العشرة آلاف بنفس طريقة الشركة مع زيادة وزن العينة إلى ٢ جم ، ٣ جم، بدلاً من ١ جم المستخدمة فى طريقة الشركة .

وكانت النتائج كالآتى:

١ - لم تظهر أى فاعلات جانبية أو قراءات إمتصاص متداخلة وغريبة تؤثر على الناتج من أى اختبار من الاختبارات التى تم إجراؤها . كما أعطيت عينات اللحوم الشائعة النقية من آثار الخنزير نتائج سلبة بوضوح تام .

٢ - بتطبيق طريقة الشركة بالضبط أمكن الكشف عن آثار لحم وشحم الخنزير الخام حتى تركيز ١ فى الألف بوضوح تام لا يقبل الالتباس .

٣ - أعطيت أغلب عينات منتجات اللحوم الدانيماركية السابق لكشف عنها بمعرفة الهيئة نتائج موجبة لوجود آثار لحم وشحم الخنزير بتطبيق طريقة الشركة .

٤ - لم تعطى أى عينة من عينات منتجات اللحوم المستوردة التى تم سحبها من السوق ومن محلات الوجبات السريعة بمعرفة أعضاء فريق العمل أى نتائج موجبة الوجود آثار لحم الخنزير بتطبيق طريقة الشركة .

٥ - بتطبيق التعديلات التى أدخلها فريق العمل أمكن الكشف عن آثار مخلوط لحم وشحم الخنزير الخام الملوث للحم البقر حتى تركيز واحد فى المليون بوضوح تام وعند استبدال محلول الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم أعطى تركيز واحد فى المليون نتائج موجبة أيضاً ولكن أقل وضوحاً ، فى حين أعطى لحم البقر النقى من آثار لحم الخنزير تماماً المستخدم فى التجربة نتيجة سالبة بوضوح تام عند تطبيق نفس تعديلات الهيئة سواء باستخدام محلول الاستخلاص أو محلول كلوريد الصوديوم فزيادة وزن العينة إلى ٢ جم أو ٣ جم مع تطبيق طريقة الشركة بالضبط رفع القدرة على الكشف عن آثار لحم الخنزير إلى تركيز ١ فى الخمسة آلاف بوضوح تام بدلاً من ١ فى الألف التى تم التوصل إليها باستخدام ١ جم عينة فقط .

طبقاً لما أوردته الشركة فإنها تستخدم لحساب القيمة الحدية Catoff value فى مختبراتها عمل حساسية قدره ٢,٥ أى أن أى قيمة امتصاص للعينة لا تعتبر موجبة إلا إذا ارتفعت إلى ضعفين ونصف لمتوسط قيم الامتصاص للضوابط السالبة Negative cont ولكن ولارتفاع الحساسية الشديدة لمجموعات الكشف التى استخدمها فريق العمل فإن عامل الحساسية عند حسابه أساس تركيز آثار خنزير فى الألف (وهو الذى أعطى نتائج واضحة تماماً) أعطى عامل حساسية يزيد على ٦ أى أن قيمة الامتصاص معينة الملوثة بلحم الخنزير حتى ١ فى الألف تزيد على ستة أضعاف متوسط قيم الامتصاص للضوابط السالبة وهذا يدل دلالة واضحة على أن مجموعات الكشف المستخدمة جيدة جداً وسبب ذلك قد يعود إلى عدة عوامل منه حرص الشركة على إرسال مجموعات جيدة إلى المملكة . ولحرص المملكة منبع العقيدة الإسلامية على الحصول على أدق الطرق للكشف عن لحم ودهن الخنزير من ناحية أخرى هذا بالإضافة إلى عملين آخرين وهما النقل السريع والسليم والتخزين الجيد لهذه المجموعات فى ثلاجة الهيئة مما يحافظ على سلامتها .

ومما سبق يمكن استخدام طريقة كورتكس الانجليزية وضع التعديلات التى استنبطها فريق العمل للكشف عن آثار لحم ودهن الخنزير فى اللحوم ومنتجاتها غير المعاملة حرارياً حتى تركيز واحد فى المليون بوضوح تام .

مخطط رقم ١ :

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
(P +) Positive Control (Pig) ضمن محتويات الـ Kit	٣,٤٣٦	√	
(C +) Negative Control (Cow) ضمن محتويات الـ Kit	٠,٢٠١		√
(H +) Negative Control (Horse) ضمن محتويات الـ Kit	٠,٢١٨		√
لحم بقر ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٩٩		√
لحم غنم ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢٣٣		√
لحم جمل ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢١٧		√
لحم دجاج ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٦٣		√
لحم أرانب ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢٤٣		√
لحم سمك ١٠٠ ٪ تم الكيشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٣٦		√
فول صويا ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٨٣		√
لحم خنزير ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٣٠٦	√	
لحم خنزير ١ ٪ فى لحم بقر الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٢٥٢	√	
لحم خنزير ٥, ٪ فى لحم بقر الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٢١٧	√	
لحم خنزير ١, ٪ (١ فى الألف) فى لحم بقر الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	١٠٢٣٥	√	
مستخلص لحم خنزير مخفف بمحلول ملحى إلى ١ ٪ طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٢٩١	√	
مستخلص لحم خنزير مخفف بمحلول ملحى إلى ١, ٪ (١ فى الألف) طبقاً لطريقة الشركة	٠,٤٧٣		√

حساب النتائج :

$$\text{(M. N. C) Mean of negative control} = \frac{(C\,-) + (H\,-)}{2}$$

$$\frac{٠,٢١٨ + ٠,٢٠١}{٢} = ٠,٢٠٩٥$$

قيمة عامل حساسية الـ Kit طبقاً لشركة كورتكس

ف = ٢,٥

القيمة الحدية (Cut off value)

= ف × متوسط امتصاص السالبة

= ٢,٥ × ٠,٢٠٩٥ = ٠,٥٢٤

∴ كل قيمة امتصاص تساو أو تزيد على ٠,٥٢٤ بها آثار لحم وخنزير .

١ - قيم الامتصاص الموجبة عالية جداً مما يدل على شدة حساسية الـ Kit .

٢ - قيم الامتصاص السالبة منخفضة مما يدل على عدم ظهور تفاعلات ثانوية .

٣ - العينة رقم ١٦ سالبة رغم ارتفاع قيمة الامتصاص لأنه تم تخفيف المستخلص بالمحلول الملحى وليس باللحم مباشرة فأصبحت آثار لحم الخنزير أقل من قدرة الـ Kit طبقاً لطريقة الشركة .

مخطط رقم : ٢ (جميع العينات تم الكشف عنها طبقاً لطريقة الشركة) :

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
(P +) Positive Control (Pig) ضمن محتويات الـ Kit	٣,٣٤٧	√	
(C +) Negative Control (Cow) ضمن محتويات الـ Kit	٠,١٩٩		√
(H +) Negative Control (Horse) ضمن محتويات الـ Kit	٠,٢٢٩		
١ ٪ شحم خنزير خام فى لحم بقر	٣,٤١١	√	
١, ٠ ٪ (واحد فى الألف) شحم خنزير خام فى لحم بقر	١,٧٤١	√	
١ ٪ لحم خنزير قديم (محفوظ فى التجميد) فى لحم بقر	٣,٨٧٠	√	
١, ٪ (واحد فى الألف) لحم خنزير قديم (محفوظ فى التجميد فى لحم بقر	٠,٩٧٤	√	
محلول ملحى فقط من المستخدم فى التخفيف طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢٠٨		√
لحم مفروم من شركة وان كنج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٠,٤٩٧		√
بيف برجر من شركة وان كنج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٠,٦٩٣	√	
برجر مشوى من شركة وان كنج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٢,٠٩٦	√	
سلامى من شركة وان كنج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٣,٢٥١	√	
أقراص كفته من شركة وان كنج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٣,٦١١	√	
بيف برجر من شركة وان كنج انتاج أمبورج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٣,٤٨٤	√	
فطيرة لحم ديك رومى انتاج شركة جلاترجس بالنمسا	٠,٢٠٢		√
البيومين انسان تركيز ٥ ٪	٠,٢١٨		√

حساب النتائج :

$$\text{متوسط العينات الضابطة السالبة} = \frac{(C -) + (H -)}{2}$$

$$\frac{٠,٢٢٩ + ٠,١٩٩}{٢} = ٠,٢١٤$$

القيمة الحدية = ٢,٥ × ٠,٢١٤ = ٠,٥٣٥

أى أن كل قيمة امتصاص تساوى أو تزيد على ٠,٥٣٥ بها آثار لحم خنزير

ملاحظات :

١ - الكت قادرة على الكشف عن شحم الخنزير أى دهن الخنزير الخام (معاملة ٤ ، ٥) .

٢ - تقل قيمة الامتصاص لآثار لحم الخنزير قليلاً إذ خزنت العينة لعدة سنين وذلك لفقد كمية من البيومين الخنزير (قارن معاملة ٧ أعلاه ، معاملة ١٤ فى التخطيط رقم ١ السابق) .

٣ - أعطيت جميع العينات الدينماركية نتيجة موجبة (المعاملات ١٠ ، ١١ ، ١٢ ، ١٣ ، ١٤) عدا اللحم المفروم (معاملة ٩٠) وقد يكون السبب فقد البيومين الخنزير بطول المدة ولأن اللحم المفروم لا توجد به مواد مضافة قد تعمل كعامل حفظ .

مخطط رقم : ٣ (جميع العينات تم الكشف عنها طبقاً لطريقة الشركة) :

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
(+ P) Positive Control (Pig) ضمن محتويات الـ Kit	٣٠٦٩٢	√	
(+ C) Negative Control (Cow) ضمن محتويات الـ Kit	٠,١٩٦		√
(+ H) Negative Control (Horse) ضمن محتويات الـ Kit	٠,٢١٩		√
١ ٪ خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٣,٣٩٨	√	
١ ٪ خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٣,٤٨٠	√	
١ ٪ خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٣,٢٥٢	√	
٥, ٪ خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٤,٠٥٦	√	
٥, ٪ خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٣,٣١٣	√	
٥, ٪ خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٣,٤٩٥	√	
١, ٪ خنزير (واحد فى الألف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	١,٥٩٥	√	
١, ٪ خنزير (واحد فى الألف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	١,٣٨٠	√	
١, ٪ خنزير (واحد فى الألف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	١,٤٤٣	√	
٠٥, ٪ خنزير (واحد فى الألفين) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠,٨٠٨	√	
٠٥, ٪ خنزير (واحد فى الألفين) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	١,١٨٣	√	
٠٥, ٪ خنزير (واحد فى الألفين) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	١,١٩٨	√	
٠٢, ٪ خنزير (واحد فى خمسة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠,٤٩٧		√

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
٠٫٠٢ ٪ خنزير (واحد فى خمسة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠٫٥٥٠	√	
٠٫٠٢ ٪ خنزير (واحد فى خمسة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠٫٥٣٩	√	
٠٫٠١ ٪ خنزير (واحد فى العشرة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠٫٤١١		√
٠٫٠١ ٪ خنزير (واحد فى العشرة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠٫٢٨٩		√
٠٫٠١ ٪ خنزير (واحد فى العشرة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) فى بقر	٠٫٣٧٩		√
مقانق فرانكفورت من شركة أمبورج انتاج ١٩٩٢	٠٫١١٢		√
بيف برجر من شركة أمبورج انتاج ١٩٩٢	٠٫١٣٧		√
بيف برجر من شركة باريبكيو انتاج ١٩٩٢	٠٫١٥٨		√
شرائح بقر مفروم من شركة ونديز انتاج ١٩٩٢	٠٫١١٧		√
لحم سجق عجل صغير Sausage من شركة الزامل انتاج ١٤١٣ هـ	٠٫١٩٣		√
شرائح لحم ديك رومى مدخن انتاج ١٩٩٣	٠٫١٥٨		√
كفته بقر انتاج شركة ساريا انتاج ١٩٩٢	٠٫١٦٨		√
Veal Beff Bacon مدخن ٢٣٦ ج	٠٫١٣١		√
فليه عجل ٧٥٤ ج	٠٫١٢١		√
عجل صغير انتاج هولندا	٠٫١٦١		√
سندوتش من السوق	٠٫١٥٣		√

متوسط العينات الضابطة السالبة = $\frac{(C -) + (H -)}{2}$

$\frac{٠,٢١٩ + ٠,١٩٦}{٢}$ = ٠٠,٢٠٧٥

القيمة الحدية = ٢,٥ × ٠,٢٠٧٥ = ٠,٥١٩

أى أن كل قيمة امتصاص تساوى أو تزيد على ٠,٥١٩ بها آثار لحم خنزير

ملاحظات :

١ - قدرة الكت على الكشف طبقاً لطريقة الشركة بالضبط تصل بصفة أكيدة إلى الكشف عن آثار خنزير بالعينة تركيزها ١, ٪ أى واحدة فى الألفين أو ٠٢, ٪ أى واحدة فى الخمسة آلاف فقد تكون موجبة ولكن غير شديدة الوضوح أما بالنسبة تركيز ٠١, ٪ أى واحد فى العشرة آلاف فلا قدرة لها عليه .

٢ - العينات رقم ٢٢ إلى ٣٢ أحضرها بعض أفراد فريق العمل من وزارة التجارة بمعرفتهم ولم يظهر آثار خنزير فى أى عينة منها .

مخطط رقم ٤ : تم الكشف عن العينات فى هذا المخطط كما يلى :

١ - العينات أ (من رقم ٣ : ٢٦) :

تم الكشف عنها طبقاً للتطوير الذى أدخله المختبر الغذائى كاملاً بالهيئة .

٢ - العينات ب (من رقم ٢٧ إلى ٤٢) :

تم الكشف عنه طبقاً للتطوير الذى أدخله المختبر الغذائى كاملاً فيما عدا استخدم المحلول الملحى الذى أوصت به الشركة بدلاً من محلول الاستخلاص الذى ابتكره المختبر الغذائى بالهيئة .

٣ - العينات جـ (من رقم ٤٨ إلى ٢٥٦) :

تم الكشف عنها طبقاً لطريقة لشركة تماماً فيما عدا زيادة وزن العينة كما هو بين أمام كل منها فى الجدول .

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
(Cow) Negative Control (C +) ضمن محتويات المجموعة	٠,٢٠٤		√
(Horse) Negative Control (H +) ضمن محتويات المجموعة	٠,٢٣٠		√
محلول الاستخلاص الذى ابتكره المختبر الغذائى	٠,١٩٥		√
محلول الاستخلاص الذى ابتكره المختبر الغذائى	٠,١٩٨		√
محلول الاستخلاص الذى ابتكره المختبر الغذائى	٠,١٨٩		√
لحم بقرى نقى ١٠٠ ٪ فى محلول استخلاص	٠,١٩٧		√
لحم بقرى نقى ١٠٠ ٪ فى محلول استخلاص	٠,١٩٤		√
لحم بقرى نقى ١٠٠ ٪ فى محلول استخلاص	٠,٢٠٤		√
لحم خنزير ٠١, ٪ (واحد فى الألف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥٢٣	√	
لحم خنزير ٠١, ٪ (واحد فى الألف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥٨٩	√	
لحم خنزير ١, ٪ (واحد فى الألف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٣٨٥	√	
لحم خنزير ٠٥, ٪ (واحد فى الألفين) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٣٤٦	√	
لحم خنزير ٠٥, ٪ (واحد فى الألفين) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥٤٤	√	
لحم خنزير ٠٥, ٪ (واحد فى الألفين) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٦٠٣	√	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
لحم خنزير ٢, ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٤٩٧	√	
لحم خنزير ٢, ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥١١	√	
لحم خنزير ٢, ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٣١٣	√	
لحم خنزير ٠١, ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٢٢٨	√	
لحم خنزير ٠١, ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٣٠٥	√	
لحم خنزير ٠١, ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٤,٠٥٣	√	
لحم خنزير ٠٠١, ٪ (واحد فى المائة ألف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٢٧٠	√	
لحم خنزير ٠٠١, ٪ (واحد فى المائة ألف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٨٤٧	√	
لحم خنزير ٠٠١, ٪ (واحد فى المائة ألف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٢١٩	√	
لحم خنزير ٠٠٠١, ٪ (واحد فى المليون) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٤١٩	√	
لحم خنزير ٠٠٠١, ٪ (واحد فى المليون) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	١,٤٢١	√	
لحم خنزير ٠٠٠١, ٪ (واحد فى المليون) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	١,٢٩٠	√	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم حنزير	لا يوجد لحم حنزير
لحم بقر نقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحى	٠,١٦٥		√
لحم بقر نقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحى	٠,١٦٢		√
لحم بقر نقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحى	٠,١٧١		√
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى الألف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٢٧٨	√	
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى الألف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٣٩١	√	
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى الألف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٦٠٦	√	
لحم بقر نقى ٠,٠٥ ٪ (واحد فى الألفين) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٧٧	√	
لحم بقر نقى ٠,٠٥ ٪ (واحد فى الألفين) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٤٣٤	√	
لحم بقر نقى ٠,٠٥ ٪ (واحد فى الألفين) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٨٤٥	√	
لحم بقر نقى ٠,٠٢ ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٣٧١	√	
لحم بقر نقى ٠,٠٢ ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٥٠٨	√	
لحم بقر نقى ٠,٠٢ ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٣٤٦	√	
لحم بقر نقى ٠,٠١ ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٣٢٠	√	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم حنزير	لا يوجد لحم حنزير
لحم بقر نقى ٠١, ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٦٨٦	√	
لحم بقر نقى ٠١, ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٩١٠	√	
لحم بقر نقى ٠٠١, ٪ (واحد فى المائة ألف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٢١٣	√	
لحم بقر نقى ٠٠١, ٪ (واحد فى المائة ألف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,٢٤٣	√	
لحم بقر نقى ٠٠١, ٪ (واحد فى المائة ألف) فى لحم بقر محلول ملحى	٣,١٧٢	√	
لحم بقر نقى ٠٠٠١, ٪ (واحد فى المليـون) فى لحم بقر محلول ملحى	٠,٨٤٣	√	
لحم بقر نقى ٠٠٠١, ٪ (واحد فى المليـون) فى لحم بقر محلول ملحى	٠,٨٧٧	√	
لحم بقر نقى ٠٠٠١, ٪ (واحد فى المليـون) فى لحم بقر محلول ملحى	٠,٩١٠	√	
٢ مم عينة لحم خـنزير وتخفيف بمحلـول ملحى إلى ١, ٠ (واحد فى الألف) طبقاً للشركة	٣,٢٧٠	√	
٢ مم عينة لحم خـنزير وتخفيف بمحلـول ملحى إلى ٠٥, ٠ (واحد فى الألفين) طبقاً للشركة	١,٧٠٥	√	
٢ مم عينة لحم خـنزير وتخفيف بمحلـول ملحى إلى ٠٢, ٠ (واحد فى الخمسة آلاف) طبقاً للشركة	٠,٩١٦	√	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحى إلى ١٠٠ , (واحد فى العشرة الاف) طبقاً للشركة	٠,٥٥٥	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحى إلى ١ , (واحد فى الألف) طبقاً للشركة	٣,٤٠٦	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحى إلى ٥٠٠ , (واحد فى الألفين) طبقاً للشركة	١,٧٧٨	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحى إلى ٢٠٠ , (واحد فى الخمسة الاف) طبقاً للشركة	١,٣٩٥	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحى إلى ١٠٠ , (واحد فى العشرة الاف) طبقاً للشركة	٠,٧٨٦	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحى إلى ١٠٠ , (واحد فى العشرة الاف) طبقاً للشركة	٠,٧٣٤	√	

متوسط العينات الضابطة السالبة = $\frac{(C -) + (H -)}{2}$

$$٠,٢١٧ = \frac{٠,٢٣٠ + ٠,٢٠٤}{٢}$$

القيمة الحدية = ٢,٥ × ٠,٢١٧ = ٠,٥٤٣

أى أن كل قيمة امتصاص تساوى أو تزيد على ٠,٥٤٣ بها آثار لحم خنزير

ملاحظات :

١ - لم تستخدم الضابط الموجب (+ P) Positive control (Pig) لأن فائدة

الضابط المـوجب الوحيد هو إثبـات أن الكت مازالت صالحة ولا تـستخدم قيمة الامتصاص الناتجة عنه فـى الحسابات وقد استخدم فى هذا المخطط ٧ شرائط سـبق استخدام ٨ عينات (٧ × ٨ = ٥٦)(وهذه الشرائـط مأخوذة من كت سبق استخدام الضابط الموجب بها وثبت صلاحيتها (الكت الواحد ١٢ شريط) تكشف على ٩٣ عينة + ٢ ضابط موجب أى ٩٦ (٨ × ١٢ = ٩٦) .

٢ - عينـات محلول الاستخلاص فقط (٣ «أ» ، ٤ «أ» ، ٥ «أ») أعطت نتيجة سالبة بوضوح .

٣ - عينات لحم البقر النقى ١٠٠ ٪ فى محلول استخلاص طبـقاً للطريقة التى ابتكرها المختبر أعطت نتيجة سالبة بوضوح .

٤ - عينات لحم البقر النقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحى فقط طبقاً للطريقة التى أبتكرها المخـتبر أعطت نتيجـة سالبة بوضوح وقد سبـق أن أعطى المحلول الملحى فقط فى مخطط رقم ٢ عينة ٨ نتيجة سالبة أيضاً .

٥ - عينات لحم الخنزير حتى تركيز واحد فى المليـون طبقاً للطريقة التى ابتكرها المختبر سواء مع استخدام مـحلول الاستخلاص (عينات ٢٥ «أ» ، ٢٦ «أ» ، ٧ «أ») أو باستخدام محلول ملحى (عينات ٤٥ «ب» ، ٤٦ «ب» ، ٤٧ «ب») أعطت جميعهـا نتيجة موجبة ولو أنها كانت واضـحة جداً باستخدام محلول الاستخلاص الذى ابتكره المختبر عن المحلول الملحى الذى أوصت به الشركة .

٦ - الفارق بين عينـات لحم البقر ١٠٠ ٪ ولحم البقر الملوث بـأى آثار للخنزير حتى جزء واحد فـى مليون جزء من لحم البـقر على جميع المسـتويات كان كبيراً جداً وواضح ممـا يسهل حتى التفرقة بـينهما فى نهاية التـجربة بالعين

المجردة دون الاعتماد على قياس الامتصاص الضوئى لها باستخدام Microplate reader .

٧ - استخدام وزنات أكبر من العينة (٢ مم ، ٣ مم) عما يستخدم لطريقة الشركة (١ مم) يؤدى إلى القدرة على الكشف حتى واحد فى الخمسة آلاف آثار لحم الخنزير .

المناعة الكيميائية فى الكشف عن
لحـــوم الاغنـــام والخـــنزير والخيـــل
فى منتجات لحوم الابقار
بالامصال المضادة لميوجلوبين هذه الحيوانات

Hayden, A. R.: Immuno chemical Detection of ovine, porcine and Equine Flesh in beef products, with Antisera to species Myoglobin. J. of food science - vol. 44. No.2 (1979)

المناعة الكيميائية فى الكشف عن لحوم الأغنام والخنزير والخيل فى منتجات لحوم الأبقار بالأمصال المضادة لميوجلوبين هذه الحيوانات

أساس الطريقة:

الأمصال المضادة للميوجلوبين المعزول من لحوم الأغنام والخنزير والخيل تستخدم فى الكشف عن لحوم هذه الحيوانات بطريقة الانتشار فى الآجارجيل.

تحضير الميوجلوبين:

يحضر ميوجلوبين الأغنام والخنزير والأبقار من قلوبهم (Awad & Kotite 1966, Atassi etal 1970)) وهى باستخلاص الميوجلوبين من المستخلصات المائية لعضلات قلوب الحيوانات السابق ذكرها بواسطة الديلزة فى ١٠٠٪ محلول مركز من $(NH_4) SO_4$ بعد إزالة الهيموجلوبين وبروتينات الساركوبلازما بوأسطة محلول سب أسيتات الرصاص (٢٠٪)، فوسفات البوتاسيوم (1.65 MK_2HPO_4 &1.35 $MKH_2 PO_4$)، ٧٠٪ من محلول مركز من $(NH_4)_2 SO_4$.

قبل استخدام الانتيجن، ومستحضرات الميوجلوبين والمديلزة ضد الماء حتى خلوها من السلفات ($Ba Cl_2$ test)، المجففة بالتجمد ومحفوظة عند درجة حرارة - ٢٠°س (يحضر ميوجلوبين الخيل من لحومها).

تحضير الانتيجين:

١- يؤخذ ٦٦ جرام محلول ميوجلوبين من لحوم كل من الخيل والأبقار والأغنام (حُولى) وتوضع على محلول محايد للفوسفات (أس هيدروجينى

.(٦,٨

٢- يسخن المحلول عند درجة ٩٠ س لمدة ١٥ دقيقة.

٣- سيظـل بعض المواد غير الـقابلة للـذوبان فى محالـيل ميوجلوبـين الأغنام (حَوَالى) والأبقار لم تخرج من المحلول.

٤- كل مـحلول من الانـتيجن يـتحد كامـلا مع ١٠ ملل من مـحلول فرونـيد Freund,s adjuvant مذابًا فى بـى تى - ١٠ بولـى ترون (PT-10 Poly-tron)، ولزيادة قوة الانتيـجن يرسب بروتينه بواسطـة الألومنيوم (proom 1943) ويعـكر بواسطـة واحد إن صوديـوم هيدروكسـيد (I N NaoH) ويستخدم المحلول بدون إزالة العكارة بواسطة جهاز الطرد المركزى، ويغسل من الرواسب.

الأمصال المضادة Antiseora

١- مجـموعـات من الأرانـب كل مـنهـا ٣ أرانب تـستـخدم كـعائـل وسيـط لميوجلوبـينات الحيوانات. كل مجموعـة تحقن أسبوعيا لمدة خمـسة أسابيع بالانتيجن المحتـوى على الميوجلوبين من لحوم الخيل وعـضلة قلب كل من الحمـلان والبـقر(٦١, ٠ مـلل) (كـل مجمـوعة خـاصة بـنوع واحـد من الحيوانات) فى وسادة قدم الحوافر (٣, ٠ ملل/ وسادة حافر)، ٥, ٠ ملل تحت الجلد (١, ٠ ملل/ مكان) على ظهر القفص الصدرى.

٢- تنزف الأرانب أسـبوعيا من الوريد الأذنى بـعد كل نزفة يعطـى واحد ملل راسب الألومنيوم الانتيجينى فى البريتونيوم، واحد ملل فى الوريد.

٣- يجمع الـدم فى أنابـيب جهاز الـطرد المركزى سـعة ٥٠ مـلل وتترك حـتى التجلط عـند درجة حرارة ٢٥° س لمدة ثـلاث ساعات ويـترك عنـد درجة

حرارة ٤° س طول الليـل وتدور فى جهاز الطرد المـركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة.

٤- تحفظ الأمصال المضـادة عند درجة حرارة -١٥° س فى محلـول مرثيولات (١ : ١٠,٠٠٠) كمادة حافظة.

٥- يجفف بـالتبريد مضاد مصـل الماعز لميوجلوبـين الخنزير المتحصل عـليه من Coppel Laboratories وذلك لاحـتوائـه المـنخفـض لمضـادات الأجسـام Antibody، والأمصـال المضـادة لميـوجلـوبين الخنـزير (٢ مـلل مـجفـفة بالتجميد) تخفف بواسطة ٥ مـلل ماء مقطر محتوية على ٠٢, ٪ صوديوم أزيد كمادة حافظة.

٦- الحلقة الإيجابية للجسم المرسب تحتوى على ١,١٦ - ١,٣٢ من تخفيفات الأمصال المضادة.

الامتصاص المناعى لمضادات الأمصال لميوجلوبين للأغنام:

(Immunoabsorption of anti-lemb myoglobin antiserum).

- محاولة إيقاف التدخلات التفاعـلية لمضادات الأمصال من الأمصال المضادة لميوجلوبين الأغنام بواسطة الامتصاص المـناعى بالميوجلوبين البقرى المقرون بالاجـاروز غير الذائـب والممتص بـواسطة لحـوم البقر الـطازجة. العـيار الحجمى لباقى مـضادات الأجسام أصبح منخفض التأثـير فى الجسم المقاوم المرسب للتحليل. نجاح الامتصاص المنـاعى بتجفيف مستخـلصات اللحوم بالتجميد كما شرحت سابقًا (warnecke & saffle 1968b)
- يوزن ٩٠٢ جرام من لحوم الـبقر المفرومة الطازجة ويوضـع حجم مساوى من الماء عـند درجة حـرارة ٤س عليهـا لمدة ٢٤ ساعـة ثم تدور فى جـهاز

الطرد المركزى عند ١٠٢٠ لفة فى الدقيقة لمدة ٣٠ دقيقة.

- يؤخذ السائل الطافى ويجمد بالتجفيف ويحفظ عند -١٥°س مقسم إلى أجزاء كل منها ١٠-١٥ ملم لاستخدامها فى امتصاص ٢ ملل من مضادات الأغنام لمضادات الأمصال لإزالة مضادات الأجسام لميوجلوبين لحوم الأبقار. الأمصال المضادة لخليط مستخلص لحوم الأبقار يحضن فى درجة الغرفة العادية لعدة ساعات ثم فى درجة حرارة ٤° طول الليل ثم يدور فى جهاز الطرد المركزى.
- يحضر اس دى اس - الهجرة الكهربائية للاكريلامين جيل (Lee etal 1974).
- يحضر السجق (مقانق) ومستخلصاته (Hyden 1977)
- الهجرة الكهربائية للمناعة (Immuno electrophoresis Hyden, 1977 experiments) يوضع الأجار ١٪ فى او. إم محلول باربيتال (اس هيدروجينى ٨,٤) بمدة انفصال ٠,٥ ساعة عند العمل حتى يبقى بروتين اللحوم سالب الشحن وقابلية التحرك أكبر من الألبيومين على الشريحة.

التعليق: (النتائج)

- الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة لعديد الأكريلاميد (شكل ١) (Polyacrylamide Electrophorsis)
- الشكل الأول يدل على أن الهجرة الكهربائية متحركة فى ميوجلوبين لحوم عضلات القلب للبقر (B) والغنم (L) تشبه حركة لميوجلوبين لحوم الخيل. النتائج (لم ترى) المشابهة لميوجلوبين عضلات قلب الخنزير. الوزن الجزيئى متماثل بوضوح. العالم لينينجر ١٩٧٥ (Lehninger 1975) وجد أن الوزن

الجزيئى لميوجلوبين لحوم عضلات قلب الخيل ١٦,٩٠٠ كما أن العالمان ساتيرل وأشاريا ١٩٧٢ (satterle and zachariah 1972) وجدوا أن الوزن الجزيئى لميوجلوبين الغنم ١٧,٧٥٣ وللخنزير ١٧,١٤٢.

- ميوجلوبين اللحوم وعضلات القلب مفروض أن تتشابه فى المناعة. العالمان كاجان ولينذر ١٩٦٨ (Kagan & Linder 1968) لم يجدوا اختلافًا فى المناعة بين ميوجلوبين عضلات القلب واللحم فى البط. العالمان كاجان وجروفيش ١٩٦٧ (Kagan & Gurevich, 1967) وجدوا أن ميوجلوبين عضلات القلب واللحم فى الإنسان متطابقة فى تفاعلات أجار جيل الترسيبية مع مضادات الأجسام فى الأرانب لميوجلوبين عضلات الإنسان.

- الاختلاف الذاتى الصغير تمت رؤيته فى ميوجلوبين من عديد المصادر. تحضير ميوجلوبين لحوم الخيل يحلل إلى ثلاث مركبات متجانسة (Lewis & Schweigert, 1955)، (Akeson & Theorell, 1960)، (Perkoff et al.) 1962) عزلت ٤ مركبات هيماتين ملائمة من ميوجلوبين الإنسان بواسطة كروماتوجراف السليولوزى DEAE (المركبات المختلفة لم تبحث).

- تحضير اثنين من مضادات الأجسام للأرانب من ميوجلوبين الغنم تم تحضيره إلى حد كبير من تداخل التفاعلات (شكل ٢). مستخلص لحوم البقر توضع فى جميع الحفر ويتوقع حدوث تفاعلات داخلية مع لحوم البقر وهذه تعضدد بواسطة انتشار ثنائى فى التجربة وأعلى الحفر كما فى شكل ٢ يحتوى على سجق بقرى مغشوش بـ٥٪ لحوم خيل وضع مكان محلول ميوجلوبين الخيل، لم يحدث ترسيب، ميوجلوبين لحوم البقر يدل ضمنيا على التفاعل فى حفر البقر والخنزير فى هذا الوقت.

- تداخل التفاعل للمناعة الكيميائية بين أنواع الميوجلوبين ثم دراستها. كاجان ولينذر ١٩٦٨ (Kagen & Linder 1968) وجدوا التفاعلات متطابقة بين

الأمصال المضادة لميوجلوبين البط والحمام والدجاج وهى أجناس لها علاقة قريبة من بعضها، أتاسى وآخرون ١٩٧٠ (Atassi et al 1970) وجدوا التفعلات الترسيبية للأجار جيل متماثلة بين الأمصال المضادة لميوجلوبين الإنسان والقرد والجمل والفرس. التفاعل الترسيبى بالأمصال المضادة لميوجلوبين الماعز يشير إلى أن ميوجلوبين الأغنام والأبقار لها ٩٠ ٪ من تأثير ميوجلوبين الماعز.

- نتائج تفاعلات الأجار جيل بين كميات ثابتة لميوجلوبين لحوم البقر والأمصال المضادة لميوجلوبين الأغنام سابقة الامتصاص بكميات متدرجة من مستخلص لحوم الأبقار المخفف بالتجميد كما هو مبين فى شكل ٣. إزالة التداخل التفاعلى لمضادات الأجسام يشير إلى نقص كثافة خطوط الترسيب عند امتصاص الحفر ٥٠ ملجم من المستخلص الجاف/ ٢ملل.
- شكل ٤ يوضح تفاعلات الأجار جيل بين ميوجلوبين الأغنام ومضادات الأمصال لميوجلوبين الأغنام الممتص سابقًا بكميات متدرجة من المستخلص الجاف للحوم البقر.

التفاعلات الترسيبية قوية حتى للحفر والتى تحتوى على الأمصال المضادة لميوجلوبين الأغنام (Anti - LMP Serum) امتصت سابقًا بـ٥٠ ملجم لحوم بقرية/ ملل.

هذه النتائج تدل على أن مضاد المصل الأحادى التخصيص (المحدد) يمكن تحضيره بالامتصاص المناعى بواسطة التقدير أو التعيين السابق لكميات مستخلصات اللحوم المائية الجافة بالتجميد من التفاعل الداخلى للأنواع، ويعتقد أن هذه النتائج ممكن استخدامها فى كميات مركبة لمستخلصات مجففة بالتجميد لعديد من الأنواع لإزالة مضادات الأجسام بعديد من التفاعلات الداخلية من الأمصال المضادة. بينتو ١٩٦١ (Pionto 1961) وجد أن امتصاص ١ : ٢٠٠

محلول ملحى مـخفف من الأمصال المضادة للأرانب ضد مصل الـثور بالتقدير الحجم المسبق من أمصال الجاموس والماعز والغزال لتحضير مضاد المصل المحدد ضد مصل الثور. الامتصاص مع مجموعة من الأمصال المجففة بالتجميد لهذه النوعيات يجب أن تكون بطريقة مبسطة.

- شكل ٥ يبـين التفاعلات المترسبـة على الأجار جيل بمضـاد مصل الأرانب لميوجلوبـين الأغنام الممتص سابقًا بواسـطة مستخلص لحوم الـبقر المجفف بالتجميد. الخطوط المترسبة تدل على التماثل المناعى بين ميوجلوبين الأغنام المعزول والميوجلوبين فى المستخلصات ٥، ٣ ٪ من لحوم الغنم المغشوشة بها لحوم البقر المفرومة. الخط المتماثل الممتد من مضادات الأمصال لميوجلوبين الأغنام يمكن تعـيينها (تقديرها) فى الـلحوم البقرية الطازجة المـفرومة حتى ٣ ٪ . ميوجلـوبين مستخلص لحوم الأبـقار لا يتفاعل بامتـصاص الأمصال المضادة.
- خـواص الـهجـرة الـكـهـربائـيـة (electrophoredic) والكيـمياء المنـاعية (immunochemical) لميوجلوبين الخنزير المختبر والمشروح سابقًا.
- نتائج شـكل ٦ ثـابت فى معـمل Coppel (لم يرى) ويـدل على مسـاحة الترسـيب تظهر فى مـنطقة الجلوبـيولين (globulin) للإلكتـرو فورتوجرام (electrophoretograms) المتكون بـالأمصال المضادة والمحضرة لميـوجلوبين لحوم الخنـزير. الفصـل بعد $\frac{1}{2}$ ساعـة لحماية الـفاقد من أى مـركب من الميوجلوبين المحضر أو لـلخنزير المخلـوط مـع لحـــوم البقر بنسبة ٢٥ ٪ (B, 25% p). هذا قد يكون Mobiltity أكبر من الألبيومين.

النتائج تدل على عزل الميوجلوبين من الهجرة الكهربائية والتى لها خواص مناعية تشابه مركب لحوم الخنزير المخلوط (مغشوش) به لحوم بقرية (B, 25%).

شكل ٧ يبين الـهجرة الكهربائية المنـاعية والتى تماثل فى سرايـانها شكل ٦ ولكنها مكونة بالأمصال المضادة لمصل الخـنزير. هذه النتيجة والموجود فى شكل ٦ تدل على الأمصال المضادة لميوجلوبين الخنزير محتوى على مضادات الأجسام للجلوبيولين لحوم الخنزير (instead) بدلاً من مصل جلوبيولين الخنزير.

شكل ٨ يبـين تفاعل depicts الأجار - جيـل المترسب بين المصــل المضاد للماعـز لميوجلوبين الخـنزير (ANTI - PMI Serum) ومستخلـصات اللحوم البقرية واللحوم البـقرية المغشوشة بـ٣-٥٠ ٪ لحوم خنزيـر. النتيجة تـدل على وجود ثلاث خطوط مترسبة فى الخصم عند تركيز ٥٠ ٪ لحوم بقرية وأما ظهور خطان مترسبان فى الحفر يدل على أن اللحـوم البقرية مغشوشة بلحوم الخنزير. وغياب خطوط الترسيب فى حـفر اللحوم البقرية (B, 100%) يدل على نقص فى التطابق بين ميوجلوبين الفصيلة البقرية وميوجلوبين الخنزير.

شكل ٩ يبين تفاعلات الأجار - جيل المتـرسبة بين الأمصال المضادة للماعز إلى ميوجلوبين الخنزير ومحلول مستخـلصات الأبقار المفرومة والمجففة بالتبريد (B, 100%)، ولحوم الأبقار المفرومة والمغشوشة بلحوم الخنزير (- B, 1% - P (B, 10%)، وميوجـلوبين الخنـزير (P, Mb) النـتائـج تدل عـلى عـدم وجود تفاعلات تداخلية بين ميوجلوبين الخنزير (p, Mb) ميوجلوبين الخنزير (p, Mb) يحتـوى على مركبين مـن الانتيجن واحـد لم يرى identity بـ١٠ ٪ مستخلص لحوم الخنزير والثـانى لم يشاهد identity بغش لحوم البقر بلـحوم الخنزير حتى ٣ ٪.

العينات المحضرة تبين فى شكل ٩ والتى عوملت بالحرارة حتى ٧٠°س لمدة ٣٠ دقيقة والمتـجانسة فى ١٠٠ ملل ماء مقطر يـحتوى على ٠٫٠٢ ٪ صوديوم لزيد. لا يوجد تـفاعل إيجابى بالمـتخلصات المجففة بـالتجميد فى الانـتشار فى الأجار - جيل حتى زيادة التركيز إلى ٨٠ ملجم/ ملل. النتائج التى تشاهد فى

شكل ١٠ الاختبارات (test) إيجابية فقط حتى مستوى ١٠ ٪ من الغش، والتشابه الموجود فى شكل ٩، شكل ١٠ يحتاج إلى زيادة التركيزات للمستخلصات المعاملة حراريا حتى ٨٠ ملجم/ ملل (شكل ١٠) للحصول على نتائج إيجابية دلالة على تركيز الميوجلوبين والانتيجين competence انخفض أثناء التسخين.

خطوط الترسيب للميوجلوبين فى الحفر (شكل ٩، ١٠) لا يرى identity بـ١٠ ٪ مغشوشة بمستخلص لحوم الخنزير وليس من السهولة شرحها (but might represent aMb component no loger antigenically Competent in the presence of other proteins in the mixtures).

يبين شكل ١١ التفاعلات بين الأمصال المضادة للأرانب لميوجلوبين لحوم الخيل المعاملة حراريا وغير المعاملة حراريا، ومستخلصات اللحوم البقرية الموجودة فى المقانق (السجق) والمغشوشة بـ صفر، ١، ٣، ٥ ٪ لحوم خيل، لا يوجد تفاعل فى مستخلص لحوم البقر (BEEF) ولا يوجد تفاعل تداخلى بين ميوجلوبين مستخلص لحوم البقر (BEEF) وميوجلوبين الخيل، الخطوط of identity ترى فى حفر ميوجلوبين الخيل المعاملة حراريا (H, Mb, ΔT)، ومستوى ميوجلوبين الخيل (H, Mb) وجفر مستخلصات لحوم الأبقار والمحتوية على ٥ - ٣ ٪ لحوم خيل لا يوجد بها اختلاف فى تقدير detectable بالتفاعل الترسيبى.

نجاح تعيين أو تقدير وجود ميوجلوبين الخيل فى سجق (مقانق) لحوم الأبقار المعاملة حراريا حتى مستوى ٣ ٪ غش (شكل ١١)، يحتاج إلى زيادة المستخلص حتى ٨٠ ملجم/ ملل فى النظم المعاملة حراريا بغش لحوم البقر بلحوم الخنزير للحصول على نتائج إيجابية حتى مستوى ١٠ ٪ غش لحوم خنزير.

وفشل تعيين ميوجلوبين الأغنام فى سجق لحوم الأبقار المعاملة حراريا قد ترجع هذه النتيجة إلى انخفاض الميوجلوبين فى لحوم الخنزير والأغنام. العالم لاور ١٩٥٠ (Lawrie 1950) وجد أن عضلة القلب وعضلة الحجاب الحاجز وعضلة لوجسمس Longissimnus عضلة بسواس (Poas) للخيل تحتوى فى المتوسط على أكثر من ٤٢٪ ميوجلوبين عن الموجودة فى مثيلاتها فى الخنزير.

العالم لاور ١٩٥٣ (Lawrie) وجد على wet basis وعضلة بسواس (poas) فى الخيل تحتوى على ٠,٧١٪ ميوجلوبين، ٠,٣٥٪ ميوجلوبين فى الأغنام.

والعالم سيتى وآخرون (١٩٧٣) (Setty et al 1973) وجدو أن لحوم الأرجل الخلفية للأبقار تحتوى على ١,٣٢ ملجم/ جم ميوجلوبين، ٠,٧١ ملجم/ جم للأغنام.

عن تركيزات أنواع البروتينات الخاصة بالاختبار إلى الحد الأقل initially low فى غش اللحوم يخفض بالمعاملة الحرارية، واستخدام مستخلصات منتجات اللحوم بالتجفيف بالتجميد والتجفيف بالتجميد للأمصال المضادة يسهل ضبط تركيز reagent لسرعة الحساسية للاختبار الترسبى للأجار - جيل.

العالم هلم وآخرون ١٩٧١ ((Helm et. al (1971) وجدوا زيادة حساسية لترسيب السائل وتحليلات الأجار - جيل المترسب بواسطة عزل إميون جلوبيولن immune globulins من الأمصال المضادة للأرانب لمستخلصات لحوم الخيل والأبقار، الأغنام والخنزير. من خلال استخدام أميون جلوبيولين المعزول، لابد من تقدير approximately، ٢, ملجم بروتينات/ ملل بالانتشار فى الجيل، ١٥,٠ ملجم/ ملل بروتين مغشوش بتفاعل ترسب انبوبى by tube precipitin reaction استخدام التجفيف بالتجميد للأمصال المضادة وهذا يبسط التجربة.

التحليل:

النتــائج تدل على المحــاليل المائية لــلميوجلــوبين المعزول من لحــوم الأغنام والأبقار والمعامل حــراريا حتى درجة حرارة ٩٠°س لمدة ٣٠ دقيقــة لا يغير ولا يعدل بــنية البــروتينات تــعديلا كافيــا يمكن إثبــاته مجدداً ومــختلف فــى مواقع الانتيجن.

تدل التــفاعلات فى (شــكل ١١) بين مــستخلص لحــوم السجق (مــقانق) البقرى المغشوش بلحوم الخيل (حفر البقر، الخيل ٥ ٪)، ومحلول ميوجلوبين لحـــوم الخيل (H, Mb) ومحلــول مــيوجلوبين لحــوم الخيل المــعامل حراريا (H, Mb, ΔT) يدل على الأجســام المضادة الموجودة فى هذا المصل ميوجلوبين. نشاط امتصاص الأمصال المضادة لميوجــلوبين الأغنام المعامل بالحرارة (شكل ٥) بمستخلصات لحــوم الأبقار الطازجة المفرومة والمغشوشة بلــحوم الأغنام الطازجة تدل على وجود مضادات أجسام لميوجلوبين الأغنام (الحملان)، غياب مضادات الأجسام يمكــن إثباتها بالمــعاملة الحرارية لــلميوجلوبــين غير متوقع وذلــك لفقد الميوجلوبين لطبــيعته الخاصة والتى تظهر عند درجات الحــرارة المساوية والمشابهة المستخدمة فى الدراسة ٩٠°س.

درابودت ١٩٦٩ (Draudt 1969) وجد أن ٧٥ ٪ من ميوجلوبين لحوم البقر المعزول يفقــد طبيعته الخاصة عــند درجة حرارة ٩٠° س وفى خلات الــلحوم (عند أس هيدروجينى ٥,٦ (PH 5.6) لمدة $\frac{1}{2}$ ساعة.

العالم دافيــس ١٩٦٢ Davios لاحظ أن ٥٠ ٪ من ميوجلوبين اللحوم النقية تفقد طبيعتها عند درجة حرارة ٧٦° س لمدة ساعة.

كورنــيش ١٩٧٣ (Cornish 1973) وجـــد أن ٥٠ ٪ ميوجلوبــين قونصة الرومى يفقد طبيعته عند درجة حرارة ٧٨,٥ °س.

البيومين البيــض ومصل الفصيلة البقرية والمعامــل حراريا عند درجة حرارة ١٠٠° س (Furth 1925) وكذلك جاماچى جــلوبيولين للإنسـان تفقد طــبيعتها Henney & Ishizaka 1968 (ɤ -G globulin) وتمتلك خواص أنتيجن جديد، ويختلف عن الانتيجين الطبيعى.

البروتين الطبيعى Native لا يرسب جمــيع الأجــام المضادة مــن الأمصال المضادة لــفقد طبيــعتها، البــروتين المترسب لا يــرسب كل الأجسام المــضادة من الأمصال المضادة للبروتين الطبيعى .

دافــيس (١٩٦٢) وجد أن ٥٠ ٪ من ميوجلوبين لحوم الأبقــار يفقد طبيعته عند درجــة حرارة ٦٣° س - ٧٦° س عند تــسخينه فى مــستخلص الــلحوم البقرية.

درايــودت ١٩٦٩ وجــد أن ٥٠ ٪ من الميــوجلوبين للــحوم المفرومة يــفقد طبيعته عند درجة حرارة ٤٤° س - ٧٢° س.

دافيس ١٩٦٢ وجد أن ميوجلــوبين اللحوم البقرية يفقد طبــيعته عند درجة حرارة ٧٥° س أعلى بــ١٠ ٪ فى وجود أوفا البيــومين (الغنم) (Ovalbumin) عنها فى وجــود مصل الألبيومين للأبقــار، البيومين الأغنام أقل تحــملا للحرارة عن مصل البيومين الأبقار.

يتــضح مما سبــق بأن الحرارة تــفقد الميــوجلوبــين الموجود فــى البروتيــنات طبيعته.

والألبيومين الفاقد لطبيعته had affinety للهيماتين عنه فــى الميوجلوبين غير الفاقد لطبيعته.

- التتائج تدل على الأمصال المضادة لأنــواع المستخلصات من سجق لحوم الأبقار الطــازجة أو المعاملة بــحرارة متوسطة والــلحوم المفرومة إذا كــان تركيز

الميوجلوبين فى اللحـوم الفاقدة لطبيعتها وكما يوجد بعض الميـوجلوبين الطبيعى يظل بعد التسخين.

هاشوموتو وياسى ١٩٥٧ وجدوا الميوجلوبين الطـبيعى للخيل يمكن تقديره فى مستخلص لحوم الخيل المعامل حراريا عند ٧٠ - ٨٠° س لمدة ٣٠ دقيقة أو فى وسائل معلبات لحوم الخيل المعاملة حراريا حتى درجة حرارة ١١٠° س لمدة ٦٠ دقيقة . الأمصال المضادة لـها ليس لها تأثير فى التحليلات التـرسبية لتعين لحوم الخيل فى المنتجات المعاملة حراريا حتى درجة حرارة ٨٠° س.

ويمكن تعيين لحوم الخيل المعلبة وتسخين منتجات اللحوم البقرية حتى درجة ١١٠ س تستخدم فى الاختبارات immune hemolysis test for Forssman's heterophile autigen (F-antigen).

الـ F-antigen موجود فى لحوم الخيل والأرانب الرومى (الوبر)، والكلاب والقطط والفئران وWhale وغير موجـود فى لحوم الأبقار والأرانب والخـنزير والأغنام وليست خاصة بأى نوع.

● التـداخل التفـاعلى بـين ميوجلـوبين لحوم الأبـقار والأمصال المـضادة لميوجـلوبين لحوم الأغـنام (شكل ٢) يجـوز بسبب تـقنين انتيـجن مشابـه على جزيـئات Molecules الميـوجلـوبين النـاتج من المـشابـه فى الحامـض الأميـنى Sequences فى tertiary structure للجزيئات.

هان وآخرون ١٩٧٢ وجدوا التـركيب الأولى للميوجلـوبين لحوم عضلات قلب الأغنام يخـتلف عن ميوجلوبين لحوم عضـلات الأبقار فقط فى 6 amino acid of the 153 residues/mol.

الاختـلاف ناتج مـن إعادة وضـع Ala-9and Ala-142 بواسـطة Leu-9، Met142 فى الأغنام Ala-124 فى الأبقار بـواسطة Gly-124 أغنام، Glu-144

أبقار بـواسطة Ala-144 أغنـام، Lys-145 أبقـار بواسـطة Glu-145 أغنـام، His-152 أبقار بواسطة His-152 أغنام. قلة الـتفاعل الداخلى بين مـستخلص لحوم الأبـقار والأمـصال المضـادة لميـوجلـوبين لحوم الخـيل (شـكل ١١ Well BEEF) احتمال لوجـود اختلافات فى تعينـات الانتيجن بين ميوجـلوبين لحوم الأبقار. وميوجلوبين لحوم الخيل وهذا ناتج من اختلافات فى primary وThus tertiary structure. هان وآخرون ١٩٧٠ وجدوا ١٨ حامض أمينى يختلفوا Sequential بين ميوجلوبين عضلات قلوب الأبـقار وميوجلوبين عضلات قلوب الخيل.

- مقدرة الأنتـيجين لجزيئات لمـيوجلوبين فى الـتكيف تحت الظـروف التى تسبب التغيير فى المرحلة الثالثة أو التركيب.

رشلين وآخرون ١٩٦٣ (Reichlin etal 1963) أثبتوا وجود اختلافات فى أنتيجن الـهيموجلوبين والميوجلـوبين وانقسامات الجلوبين. فصــل الجلوبين أقل من $\frac{١}{٢}$ مؤثر كـما هو فى الهيـموبروتين الأصلى. إضـافة الهيم إلى جـلوبين يحفظ قوة الانتيجين.

أتــاســى ١٩٦٧ (Atassi 1967) قـام بتـحضـيـر ميـتـالو بـورفريـن (metalloporphrins) المنجـنيز، الحديد، الـكوبلت، نـيكل، النحـاس والزنك وتركيبهم مع أبوميوجلوبين (apomyogobin).

تحضيـر ميوجلوبين الـنحاس بالمناعـة الكيميـائية متطابـقًا بالفريميوجـلوبين (Ferrimyoglobin) الأصلى بينمـا الميوجلوبينات الصناعيـة أقل نشاطًا بدرجات مختلفة مع الأمصال المضادة للفريموجلـوبين. ويبين الباحث التغيـرات فى نشاط الانتيـجين يرجع إلـى التغيـيرات فى الجزيـئات التى تحـصل باختـلاف الغرض والأهمية لمختلف المعادن.

● ظاهرة أخرى بالإضافة إلـى تغيير طبيعة البروتين الأصلـية هذا وقد يغير الشكل وكفاءة أنتيجن الميوجلوبين أثناء عملية الطهى للحوم وذللك كالآتى:

(١) تـغيـير الـفـرى هيـم لوسـى (Ferrihem Loci) بالاخـتزال التأكـسدى (Bemofeskyeral 1959).

(٢) التسخين يـحدث اتحاد ميوجلوبين بالبـروتينات الأخرى (Bemofsky et al 1959, Ledward 1971).

(٣) تحويـل فيـرى هيـم (Ferriheme) إلى بـروتيـنات لحـوم أخرى وخـاصة الألبيومين (Ledward, 1971).

● حساسيـة طريقة الأجار جيل الـترسبى تستعمـل لتعين أنواع التـغييرات الطبيعـية بالأمصال المضادة لعزل أنواع المـيوجلوبين (Warne CKE & Saffle 1968a; b, Fugate 1971) ولقد وجد هـؤلاء العلماء حدود واضـحة لخطوط الترسيب فى الانتشار فى الجيل عند مستوى ٣٪ بين مستخلصات تلوث اللحوم المفرومة البقرية بلحوم الخيل والأمصال المضادة لمستخلص لحوم الخيل.

والعالم فيوجت (Gygate) استخـدم أسلوب أو نمط الحـفر المتعـددة على جانبى ثلاث أحواض من الأجار فى البتردش (Petridish) (وهو صحن زجاجى صغير رقيق ذو غـطاء مرن يستعمل بخاصـة فى المختبرات لزع البكتيـريا) لتعيين التفاعلات التداخلية لمركبات مجهولة مع عديد من الأمصال المضادة. ولقد عين العالم فيوجت بدقة ١١ عينة من ١٢ عينـة من اللحوم البقرية الطازجة المفرومة الملوثة أو المغشوشة بالحد الأدنى ١٠٪ من لحوم الخنزير، ٥٪ من لحوم الأغنام أو الخيل، قوة الخطوط المترسبة تدل على انخفاض مستويات التلوث التى يجب تعيينها.

نظـام الأجارجيل المـشروح فى شـكل ١١ لتـعيين لحوم الخـيل فى سـجق

اللحوم البقرية بمضاد أمصال ميوجلوبين الخيل التى لا تشاهد فى التفاعلات التداخلية بين لحوم البقر والخيل (كما شرحها أيضًا Hashimoto and Yasui 1954).

- نظم الميوجلوبين ومضاد الميوجلوبين يستعمل كعمل روتينى للتعرف على الأنواع المغشوشة من اللحوم البقرية الطازجة والمنتجات المعاملة بالحرارة المتوسطة من اللحوم البقرية بالطريقة البسيطة للانتشار فى الأجارجيل. مضادات الأمصال للميوجلوبين لابد أن يكون لها تأثير كبير فى التعرف على اللحوم المغشوشة (الملوثة) من أنواع اللحوم مثل الخيل، عجل البحر (seal)، الحوت (whale) أو أى أنسجة أخرى غنية بالميوجلوبين نسبيًا. الميوجلوبين يعزل من اللحوم الرخوة نسبيًا والتى يوجد لها أنتيجين، عند حدوث التفاعل التداخلى، والأمصال المضادة والمحضرة لكل نوع مخصص من أنواع اللحوم بواسطة الامتصاص المناعى، والميوجلوبينات المقاومة للحرارة نسبيًا.

العالم لى وآخرون ١٩٧٤ (Lee et. al 1974) لاحظوا أن حزمة الميوجلوبين تختفى فى الآخر من SDS-polyacrylamide electro phoretograms للمستخلصات المائية أو المعاملة حراريا من لحوم الأبقار. قلب العينات يسخن من صفر - ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة من ٦٥° س - ٩٠° س، بالإضافة إلى اختبارات الأجارجيل المترسب تكون:

(١) سهلة التنفيذ.

(٢) رخيص نسبيًا.

(٣) سهلة التصوير عند ظهور الدليل (البينة).

التقدير فى حدود ٣٪ تقريبًا يمكن الحصول عليه من طريقة الانتشار بالأجارجيل عند اختبار اللحوم الطازجة أو المنتجات المعاملة بحرارة متوسطة.

أما الحرارة الشديدة تقلل من حساسية هذه الطريقة للمنتجات الملوثة.

DETECTING FOREIGN FLESH IN BEEF PRODUCTS

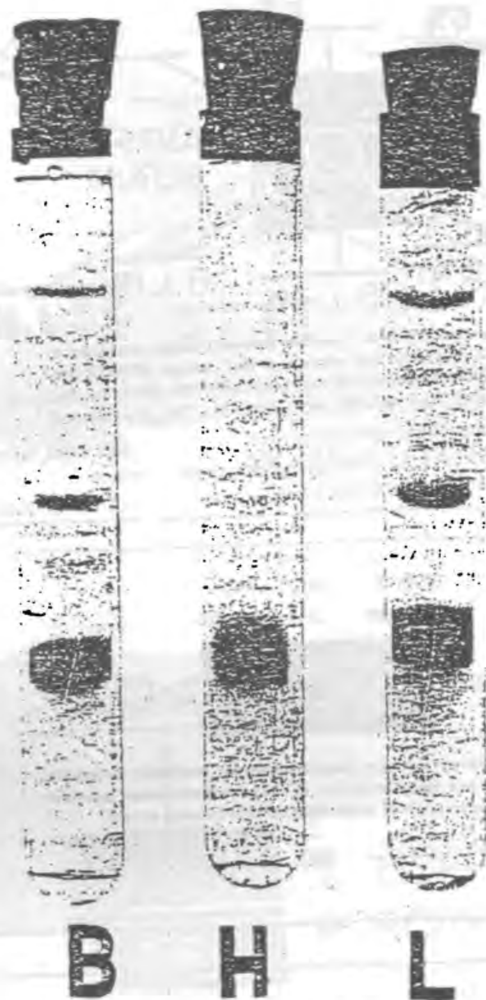


Fig. 1—SDS-acrylamide electrophoretograms of horse skeletal muscle myoglobin (H), and bovine and lamb heart myoglobin (B and L). Samples were 5 mg protein each, and electrophoresis was from top (cathode) to bottom (anode).

شكل (١)

الفصل الثالث: الكشف عن لحوم الخنزير ومتجاته فى المنتجات الغذائية

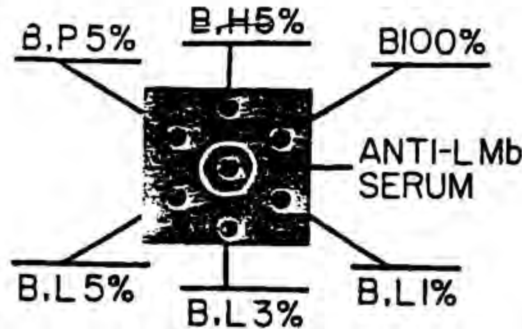


Fig. 2—Agar-gel precipitin reactions between a rabbit antiserum to lamb heart myoglobin and extracts of beef sausage (B100%); beef sausage which contained 5% pork flesh (B,P5%); 5% horse flesh (B,H5%) and 1, 3 and 5% lamb flesh (B,L1%); (B,L3%); and (B,L5%).

شكل (٢)

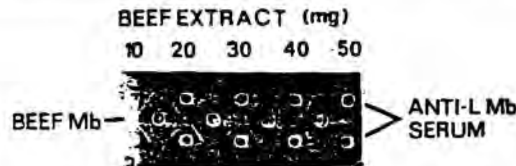


Fig. 3—Agar-gel precipitin reactions between beef heart myoglobin (1 mg/ml) and rabbit antiserum to lamb heart myoglobin absorbed with graded amounts of lyophilized aqueous extracts of beef.

شكل (٣)

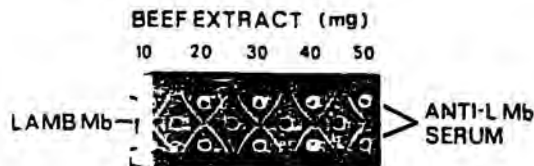


Fig. 4—Agar-gel precipitin reactions between lamb heart myoglobin (1 mg/ml) and rabbit antiserum to lamb heart myoglobin abosrbed with graded amounts of lyophilized aqueous extracts of beef.

شكل (٤)

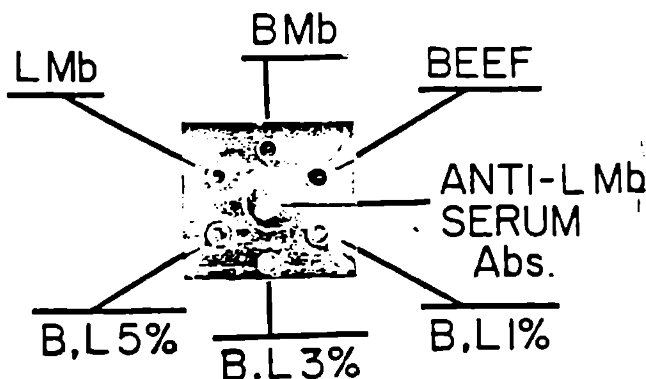


Fig. 5—Agar-gel precipitin reactions with a rabbit antiserum to lamb heart myoglobin previously absorbed with lyophilized aqueous extract of beef (50 mg/2 ml). The peripheral wells contained lamb myoglobin 1 mg/ml (LMb), beef myoglobin 1 mg/ml (BMb), extract of beef (BEEF) and extracts of beef which contained 1, 3 and 5% lamb flesh.

شكل (٥)

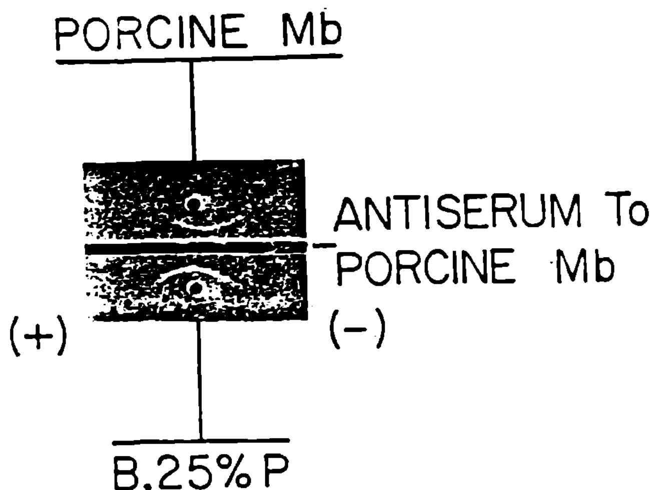


Fig. 6—Electrophoretogram of porcine myoglobin and extract of ground beef adulterated with 25% ground pork. Antiserum to porcine myoglobin was placed in the center trough after electrophoresis at Constant Voltage (5 V/cm) for 0.5 hr. The gel media was 1% ionagar in 0.1M barbital buffer pH (8.4). Sodium azide (0.02%) was used as a preservative.

شكل (٦)

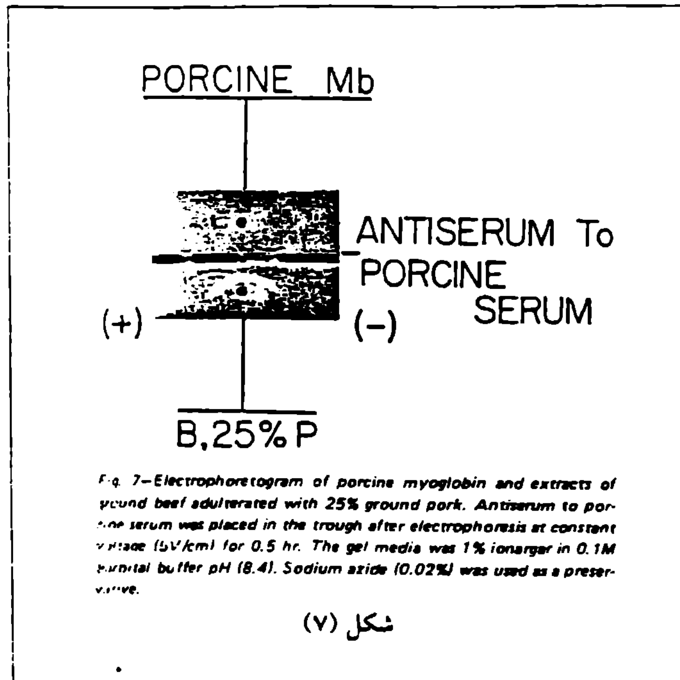


Fig. 7—Electrophoretogram of porcine myoglobin and extracts of ground beef adulterated with 25% ground pork. Antiserum to porcine serum was placed in the trough after electrophoresis at constant voltage (5V/cm) for 0.5 hr. The gel media was 1% ionagar in 0.1M barbital buffer pH (8.4). Sodium azide (0.02%) was used as a preservative.

شكل (٧)

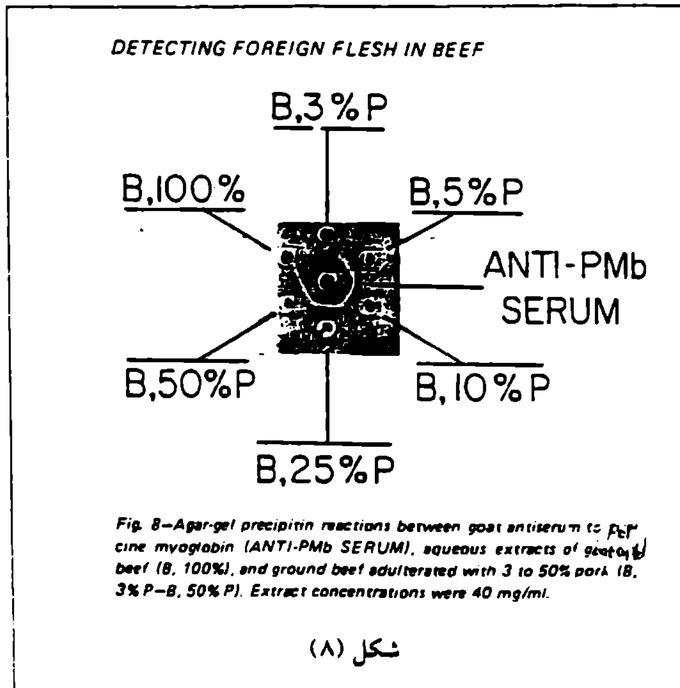


Fig. 8—Agar-gel precipitin reactions between goat antiserum to porcine myoglobin (ANTI-PMb SERUM), aqueous extracts of ground beef (B, 100%), and ground beef adulterated with 3 to 50% pork (B, 3% P—B, 50% P). Extract concentrations were 40 mg/ml.

شكل (٨)

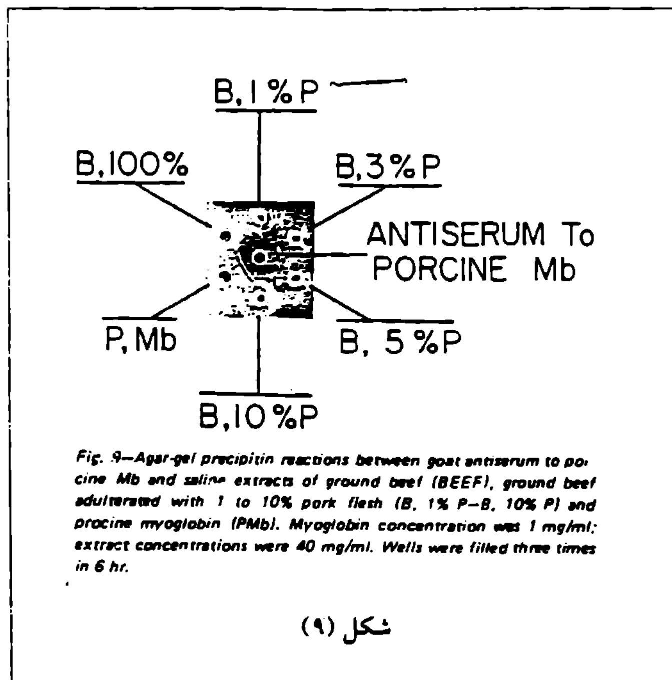


Fig. 9—Agar-gel precipitin reactions between goat antiserum to porcine Mb and saline extracts of ground beef (BEEF), ground beef adulterated with 1 to 10% pork flesh (B, 1% P–B, 10% P) and procine myoglobin (PMb). Myoglobin concentration was 1 mg/ml; extract concentrations were 40 mg/ml. Wells were filled three times in 6 hr.

شكل (٩)

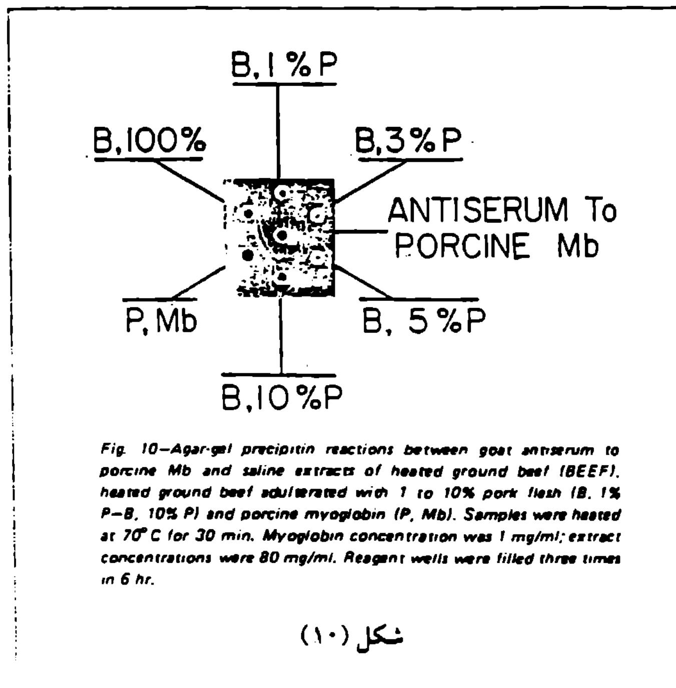


Fig. 10—Agar-gel precipitin reactions between goat antiserum to porcine Mb and saline extracts of heated ground beef (BEEF), heated ground beef adulterated with 1 to 10% pork flesh (B, 1% P–B, 10% P) and porcine myoglobin (P, Mb). Samples were heated at 70°C for 30 min. Myoglobin concentration was 1 mg/ml; extract concentrations were 80 mg/ml. Reagent wells were filled three times in 6 hr.

شكل (١٠)

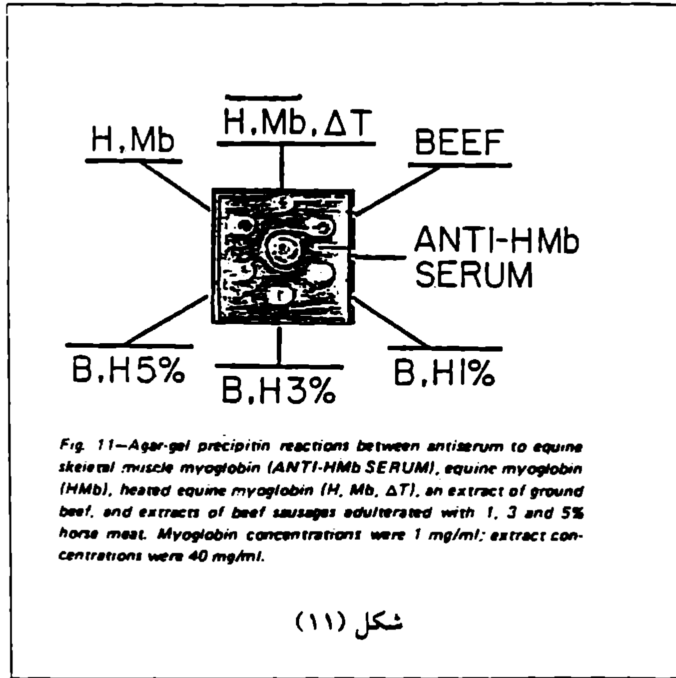


Fig. 11—Agar-gel precipitin reactions between antiserum to equine skeletal muscle myoglobin (ANTI-HMb SERUM), equine myoglobin (HMb), heated equine myoglobin (H, Mb, ΔT), an extract of ground beef, and extracts of beef sausages adulterated with 1, 3 and 5% horse meat. Myoglobin concentrations were 1 mg/ml; extract concentrations were 40 mg/ml.

شكل (١١)

المراجع:

Akeson, A. and Therorell, H. 1960. On the microheterogeneity of horse myoglobin. Arch. Biochem. Biophys. 91: 319.

Atassi, M. Z. 1967. Immunochemistry of sperm-whale my oglobins prepared withvarious moodified porphyrins and metalloporphyrins. Biochem. J. 103: 29.

Atassi, M. Z. 1973 Antigenic structures of proteins in ferred from myogglobin as the first proteins in ferred from myoglobin as the first protein whose antigenicc structure has reached completion. In "Specific Receptors of Antibodies, Antigens and Cells," 3rd Int. Convoc. Immunol., Buffalo, NY., 1972, p. 118.

Atassi, M. Z., Tarlowski, D.P. and Paull, J. H. 1970. Immunochemistry of sperm whale myoglobin. 7. Correlation of immunochemical cross-reaction of eight myoglobins with structural similarity and its dependence on conformation. Biochem. Biophys. Acta 221: 623.

Awad; E. S. and Kotite, L. 1966. Camel myoglobin. Biochem. J. 98: 909.

Beger, H. 1924. Versuche zur beseitigung der heterologen trubungen bei prazipitierenden eiweissantiseren. Zbl. Bakt. I. Orgig. 91: 519.

Bernofsky, C., Fox, J. B. Jr. and Schewigert, B. S. 1959. Biochemistry of myoglobin. 7. The effect of cookingg on myoglobin in beef muscle. Food Res. 24: 339.

Bolin, F. M. 1931. The detection of horse meat as an adulterant in

sausage, and other studies on the preciptin test. Am. Vet. Med. Assoc. 31: 163.

Cornish, D. G. 1973. Characteristics of turkey hemoproteins and their reactions in meat and model systems. University Micro-films, Ann Arbor, MI 73 - 15, 350.

Davies, C. K. Jr. 1962. The effect of heat on the water soluble proteins of beef skeletal muscle. Univ. Microfilms, Ann Arbor, MI # 62 - 3443.

Draudt, H. N. 1969. Effect of heating on the behavior of meat pigments. Reciprocal Meats Conf. Ann Proc. 22: 180.

Forssman, J. 1911. Die herstellung hochwertiger spezifischer schalfhamolysine ohne verwendung von schafblut. Einbeitrag zur lehre von heterloger antikorperbildung. Biochem. Ztschr. 37: 78; Cited by Carpenter, P. L. 1965. "Immunology and Serology, " p. 66ff. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Fugate, G. 1971. Immunodiffusion technique for the identification of animal species. J. Immunodiffusion technique for the identification of animal species. J. AOAC 54: 1152.

Fujiwara, K. 1922. Kochkoaguliertes serum als präzipitinogen Dtsch. Ztschr. f.d.ges. Gerictl. Med. 1: 562.

Furth, J. 1925. Antigenci character of heated protein J. Immunol. 10: 777.

Han, K., Dautrevaux, M., Chaila, X. and Biserte, G. 1970. The covalent structure of beef heart myooglobin. Eur. J. Biochem. 16: 465.

Han, K., Tetaert, D., Moschetto, Y. and Dautrevaux, M. 1972. The covalent structure of sheep-heart myoglobin. Eur. J. Biochem. 27: 585.

Hashimoto, Y. and Yasui, T. 1957. Researches on the detection of meat by serological test. J. Faculty Agric. Hokkaido 50 (3): 171.

Hayden, A. R. 1977. Detection of chicken flesh in beef sausages. J. Food Sci. 42: 1189.

Hayden, A.R. 1978. Determination of residual species serum albumin in adulterated ground beef. J. Food Sci. 43: 476.

Helm, M. B., Warnecke, M. O. and Saffle, R. L. 1971. Gamma globulin isolated from rabbit serum for rapid detection of meat adulteration. J. Food Sci. 36: 998.

Henney, C. S. and Ishizaka, K. 1968. Antigenic determinants specific for aggregaled y-G-globulins. J. Immunol. 100: 718.

Kagen, L. J. and Gurevich, R. 1967. Immune preciptitin reactions between and anti-human myuoglobin antiserum and several purified primate myoglobins. Immunoloogy 13: 201.

Kagen. L. J. and Linder, S. 1968. Immunological studies on duck myoglobin. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 128: 438.

Karpas, A. B., Myers, W. L. and Seagre, D. 1970. Serological identification of species of origin of sausage meats. J. Food Sci. 35: 150.

Lawrie, R. A. 1950. Some observations on factors affection myoglobin concentrations in muscles. J. Agric. Sci. 40: 356.

Lawrie, R. A. 1953. The activity of the cytochrome system in muscle and its relation to myoglobin. Biochemistry 55: 305.

Ledward, D. A. 1971. On the nature of cooked meat hemoproteins. J. Food Sci. 36: 883.

Lee, Y. B., Rickansrud, D. A., Hagberg, E.C. and Briskey, E. J. 1974. Application of SDS-acry lamide gel electrophoresis for determination of the maximum temperature to which bovine muscles have been cooked. J. Food Sci. 39: 428.

Lehninger, A. L. 1975. "Biochemistry", 2nd ed, p. 59. Worth Publishers, Inc., New York.

طريقة التعرف السريع على لحوم الخنزير
فى منتجات اللحوم بالانتشار المناعى فى الآجار جيل

(طريقة معدلة)

Mark E. Cutrufelli, Richard P. Mageau Bernard Schwab, and Ralph W. Johnston; Develpoment of porcine rapid identification Method (PRIME) by Modified Agar - Gel. Immunodiffusion. J. Assoc. off. Anal. chem. (vol. 71. No2, 1988)

طريقة التعرف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم بالانتشار المناعى فى الآجار جيل (طريقة معدلة)

أساس الطريقة:

تستخدم طريقة الانتشار المناعى فى الآجارجل للتعرف على لحوم الخنزير فى اللحوم واللحوم المفرومة ومنتجات اللحوم الطازجة.

هذه الطريقة يستخدم فيها رقائق الآجار جل مع استخراج صورة فوتوغرافية مطبوعة لضبط وتعيين المكان الملائم لاستقرار الكاشف المجفف بالتجميد على الأقراص الورقية وأقراص العينة المشبعة فى سائل اللحوم فى خلال ١٨ - ٢٤ ساعة فى درجة حرارة الغرفة، اندماج العينة بخط الترسيب المناعى بالحزام المرجعى المنشأ فى الآجار بين الانتجن المرجعى (مادة ينشأ عن حقنها فى الجسم أجسام مضادة) والأجسام المضادة الموجودة على الأقراص تدل على وجود لحوم الخنزير فى العينة.

الكواشف المعدلة:

تحضر أقراص الأجسام المضادة للحوم الخنزير وذلك بنقع الأقراص الورقية الخام فى ٤٠ ميكرولتر من مضادات لحوم الخنزير الموجودة فى البيومين الماعز.

يحضر الانتجن المرجعى للحوم الخنزير على أقراص ورقية خام بنقعها فى ٤٠ ميكرولتر من مصل البيومين فى (V) للخنزير فى محلول ملحى محايد تركيز ٠,٢ ٪ للفوسفات وأس هيدروجينى (PH) ٧,٢ تترك الأقراص لتمتص كواشفها طوال الليل فى التجميد المجفف. تحضر رقائق الانتشار المناعى والتى

يستعاض عنها بصيغة الفلورسين عند تركيز نهائى ١ : ٦٠٠٠٠ فى الآجار لتميز التعرف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم.

مميزات التفاعل:

التعيين الدقيق لاختبار التعرف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم يحدد بتفاعل الأقراص الورقية الخام المشبعة فى سائل لحوم الخنزير المتماثلة وسوائل اللحوم المختلفة (المتنافرة) المضادة للأجسام المضادة المرجعية الموجودة على الأقراص. الحساسية المطبقة على خليط اللحوم المفرومة يحدد مقدارها باختبار محضر بعينه مؤلفة (مركبة) من كميات معروفة من لحوم الخنزير المغشوش بها اللحوم الحمراء المفرومة. تكرر التجربة ثلاث مرات على مستوى غش (١-٢٢٪) بالوزن. وجود شريط من الترسيب المناعى المرئى مندمج مع الشرط المرجعى يحمل دليل اكتشاف نسبة مستوى الغش.

ثبات محتويات الكواشف:

تقيم قوة أقراص الكواشف بقوة بعض تحضيرات الأجسام المضادة للانتجن المرجعى للحوم الخنزير الموجودة فى قوارير زجاجية ذات غطاء محكم فى درجة حرارة الغرفة والمبردة (٤° س) دوريًا على فترات منتظمة ويجب أن لا تفقد قوة الترسيب المناعى.

النتائج والمناقشة:

للتحديد الدقيق للتعرف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم بالانتشار المناعى فى الآجار جل يستخدم مضادات لحوم الخنزير الموجودة فى مصل الماعز.

جدول (١)

النتائج المعملية والحقلية للتعرف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم المختلفة

المنتج	نوع وتركيب المنتج	عدد العينات	عدد العينات المخلوطة بلحوم الخنزير	العينات الإيجابية
المحاولات المعملية				
مستحلب فرانك	ماشية، خنزير، (دجاج)	٢	٢	٢
مستحلب فرانك	ماشية، خنزير، دجاج	٢	٢	٢
مستحلب فرانك	ماشية، (خنزير)	٦	صفر	صفر
مستحلب فرانك	ماشية، خنزير	٢	٢	٢
مستحلب فرانك	دجاج	٢	٢	٢
مستحلب بولوجنا	ماشية	٤	صفر	صفر
مستحلب بولوجنا	ماشية، خنزير	٢	صفر	صفر
سجق خنزير	خنزير	٢	٢	٢
سجق خنزير	خنزير، (ماشية)	٦	٦	٦
لحم مفروم	ماشية، خنزير، (دجاج)	٤	٤	٤
سجق ألمانى	ماشية ، (خنزير)	٢	٢	٢
خليط بقرى باتيه	ماشية ، (خنزير)	٢	٢	٢
لحم خنزير مفروم	خنزير، (ماشية)	٢	٢	٢
لحم خنزير مفروم	خنزير	٦	٦	٦
لحم بقرى مفروم	ماشية (دجاج)	٣	٣	٣
لحم بقرى مفروم	ماشية (خنزير، دجاج)	٢	صفر	صفر
لحم بقرى مفروم	ماشية	٢	٢	٢
لحوم الماشية	ماشية	٢	صفر	صفر
لحوم خنزير	خنزير	١	صفر	صفر
		٩	٩	٩
المجموع		٦٣	٤٦	٤٦
المحاولات الحقلية				
سجق خنزير	خنزير	٤	٤	٤
سجق إيطالى	خنزير	٨	٨	٨
لحم خنزير مفروم	خنزير	٤	٤	٤
لحم ماشية مفروم	ماشية	٢	صفر	صفر
لحم بقرى باتيه	ماشية	٢	صفر	صفر
المجموع		٢٠	١٦	١٦

تفاعل الاختبار الموجود لعينات اللحوم واللحوم المفرومة المعروف نوعها: الخنزير (+)، الخيل (-)، الماشية (-)، الغنم (-)، الغزال (-)، الدجاج (-)، الرومى (-) الكنجارو الأحمر (-). هذه النتائج دلت على أن اختبار السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم يقابل مشاكل مضادة للتفاعل (cross-reactivity) يجب ألا ترتفع إذا كان التفاعل مناسب للأجسام المضادة للخنزير فى المصل والمستخدم كأجسام مضادة على الأقراص المعدة لذلك.

حساسية هذه الدراسة تبين الغش بلحوم الخنزير من ٣-٥ ٪ فى لحوم الماشية والأغنام ويظهر شريط الترسيب المناعى عند نهاية النقط ضعيف. هذه المستويات من الحساسية تؤخذ بعين الاعتبار بملائمتها العالية للاستخدام المطلوب بهذه الطريقة.

ثبات محتوى الكواشف يستمر لمدة عام عند درجة حرارة ٤° س، ٦ شهور عند درجة حرارة الغرفة ويحبذ حفظ الكواشف فى درجة حرارة المبرد للحصول على أطول مدة ثبات.

تحليل نتائج محاولات العينات المعملية والحقلية الموجود فى الجدول السابق ذكره مجموع العينات المحللة ٨٣ منها ٦٢ عينات إيجابية محتويه على بروتينات خنزير، ٢٠ عينة سالبة لا يوجد بها بروتينات خنزير وباقى العينات غاب عنها الإيجابية أو السلبية وتعد هذه الطريقة مطلوبة فى الكشف عن لحوم الخنزير فى اللحوم ومنتجاتها، ويوصى عمل تجارب تأكيدية للنتائج الموجبة بواسطة ouchterlony immunodiffusion techinque أو باستخدام iso elecctric focusing.

هذه الطريقة تستخدم عالميًا وخاصة فى الولايات المتحدة ال أمريكية وفى المعامل التجارية.

المراجع:

* Mageau, R. PP., Cutrufelli, M. E., Schwab, B., & Johnston, R. W. (1984) J. Assoc. off. Anal. chem. 67, 949-954.

* Cutrufelli, M. E., Mageau, R. P., Schwab, B., && Johnston, R. W. (1986)J,. Assoc. off. Anal. chem. 69, 483-487.

* Cutrufelli, M. E., Maggau, R. P., Schwab, B. & Johnston, R. W. (1987) J. Assoc. off. Anal. chem. 70, 230-233.

* "Changes in Methods", (1987) J. Assoc. off. Anal. chem, 70, 389-390, sec. 24, c01- 24. c06.

* Fugate, H. G., & penn, S. R. (1971) J. Assoc. off. Anal. chem. 54, 1152-1156.

* Hamitton, W. D. (1982) J. Assoc. off. Anal. chem. 65, 119-122.

الكشف عن لحوم الدواجن والخنزير المطهية واللحوم المعلبة بطريقة الامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى

Ronald G. Berger, Richard P. Mageau, Bernard Schwb, and Ralph W. Johnston. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat Foods by Enzyme - Linked immunosorbent Assays. J. Assoc. off. Anal Chem. vol. 71, No. 2, 1988.

الكشف عن لحوم الدواجن والخنزير المطهية واللحوم المعلبة بطريقة الامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى

أساس الطريقة:

تعتمد هذه الطريقة على الاختبار المناعى بالارتباط الانزيمى ELISA بنوع معين من اللحم (الدجاج، الخنزير) على الأجسام المضادة Antibodies لهذا اللحم إلى مستخلص الأنواع المختلفة من لحوم الدواجن والخنزير المطهية واللحوم المعلبة حيث يحدث ارتباط بين جزيئات الكشاف الخاص بنوع معين من اللحم ولا يحدث ارتباط مع باقى الأنواع الأخرى:

الطريقة:

★ **تحضير الانتجين Immunizing Antigen**

١- يوزن كيلو جرام لحم طارج من كل من الخنزير والدجاج ثم يقسم كل كيلو جرام إلى أربعة أجزاء متساوية (٢٥٠ جم).

٢- يضاف لكل ٢٥٠ جم من اللحم ٥٠٠ ملل من كلوريد صوديوم ١٤, ٠مم (0.14M Nacl) وتجنس مدة ٣ دقائق فى الخلاط.

٣- يترك المخلوط لمدة ساعة فى درجة حرارة الحجرة.

٤- يدور المخلوط فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة ٤° س.

٥- يرشح السائل الطافى من خلال ورق الترشيح رقم ٤٢.

٦- يخفف الراشح بماء مقطر حتى ٩٥٠ ملل.

٧- يضاف ٥٠ ملل خلات الصوديوم ١,٠ إم (1.0M Sodium acetate) ويتبع بإضافة ٣٦١ جرام من كبريتات الأمونيوم (ammonium sulfate).

٨- بعد إذابة كبريتات الأمونيوم يترك المستخلص طول الليل عند درجة حرارة ٤° س.

٩- يدور المستخلص فى جهاز الطرد المركزى.

١٠- يؤخذ السائل الطافى ويضبط اللأس الهيدروجينى له عند ٤,٩ بإضافة حامض الهيدروكلوريك واحد إن (1N Hcl).

١١- يترك السائل فى جهاز الطرد المركزى.

١٣- يؤخذ السائل الطافى ويضبط الأس الهيدروجينى عند ٣,٧ ويترك طول الليل عند درجة حرارة ٤° س.

١٤- يكرر تدوير السائل فى جهاز الطرد المركزى.

١٥- يؤخذ السائل الطافى ويضاف إليه ٣٥٧ جرام كبريتات الأمونيوم المحببة مع التقليب بهدوء.

١٦- بعد إذابة كبريتات الأمونيوم يترك المستخلص طول الليل عند درجة حرارة ٤° س.

١٧- يدور المستخلص فى جهاز الطرد المركزى عند ٢٧٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٤° س.

١٨- يرمى السائل ويوضع على الراسب ٦٠ ملل ماء مقطر ويكرر تدوير المستخلص فى جهاز الطرد المركزى لإزالة أى مادة غير ذائبة.

١٩- يديلز (dialyze) المستخلص طول الليل ضد الماء المقطر ويركز حتى ١٠ ملل بمادة ضد الديلزة (dialysis against) ٣٠٪ محلول مائى من ٢٠ M

بولى ايثلين جليكول (20M poly ethylene glycol) الديليز المركز يستنزف بمحلول متعادل من M/ ٥٠ خلات الصوديوم عند أسس هيدروجينى ٣,٧ (تحضير المحلول المتعادل بإضافة حامض الخليك إلى 0.01M خلات الصوديوم حتى يصل الأس الهيدروجينى إلى ٣,٧).

٢٠- تزال المادة غير الذائبة بتدويرها فى جهاز الطرد المركزى.

٢١- تكرر الخطوات السابقة حتى الحصول على ٣ أجزاء متساوية من اللحم المفروم.

٢٢- يحضر كاربوكسى مثيل سليولوز ويعادل بمحلول متعادل (0.01M خلات الصوديوم، اس هيدروجينى ٣,٧)

٢٣- يزود العمود (١,٦ × ٣٥ سم) بمحلول كاربوكسى مثيل سليلوز المتعادل ويمكن تمرير المحلول المتعادل الأولى فى العمود إذا لزم الأمر.

٢٤- يوضع المنتج (polled harvest) فى العمود ويصب عليه بالتدريج ١٨٠ ملل من المحلول المحايد الأول starting buffer، ١٦٧ ملل من المحلول المحايد المحدد limit buffer (١,٠ إم خلات الصوديوم) ٢٠ ملل/ ساعة.

٢٥- يجمع ٣ ملل من الأجزاء المستخلصة ويقاس الامتصاص عند طول موجة ٢٨٠ نانومتر فى جهاز قراءة الامتصاص المناعى.

٢٦- يركز المنتج (harvest) بواسطة مضادات الديلزة (dialysis against) ٣٠٪ ٢٠ إم بولى إيشيلين جكيلول إلى ٢ ملجم بروتين/ ملل (يقدر بطريقة Lowry assay) مستخدما المصل البروتينى البقرى كمقياس (as standard) ويجب أن تكون كمية الانتيجين ٢٥ ملجم.

★ الأجسام المضادة Antibody

١- يخفف المصل المضاد بحجم مساوى من محلول ملحى محايد 0.01M فوسفات ذات أس هيدروجينى ٣,٢ عند درجة حرارة ٤° س.

٢- يضاف محلول كبريتات الأمونيوم المركز dropwise مع التقليب ويترك المحلول عند درجة حرارة ٤° س.

٣- يدور فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٠ دقاق عند درجة حرارة ٤° س.

٤- يرمى السائل الطافى ويذاب الراسب فى محلول ملحى محايد من 0.01M فوسفات.

٥- يعاد ترسيب جاما جلوبيولين أكثر من مرتين فى محلول كبريتات الأمونيوم المركز.

٦- يذاب الراسب الأخير من محلول ملحى محايد من ٠,١ إم فوسفات ثم يُديلز ضد المحلول الملحى المحايد من ٠,١ إم فوسفات.

٧- يؤخذ ٤ ملل من جاما جلوبيولين ويوضع عليها ٣٠ ملل/ ساعة محلول ملحى محايد من 0.01M فوسفات.

٨- يجمع ٤ ملل من محلول الخطوة السابقة (٧) ويقاس الامتصاص عند طول موجة ٢٨٠ نانومتر (المحلول يحتوى على IgG.

٩- يركز IgG إلى ٣ ملجم/ ملل ثم يديلز ضد محلول 0.1M كربونات الصوديوم ويحفظ عند درجة حرارة - ٢٠س أو أقل. وتستخدم IgG إما محاطة بالأجسام المضادة المغطاة أو بيوتينيلاتيد الأجسام المضادة.

★ **بيوتينيلاتيد الاجسام المضادة**

١- يخفف ١ ملجم من IgG فى ١ ملل محلول كربونات الصوديوم ١, ٠ إم.

٢- يذاب البيوتين - ن - هيدروكسى سكسينيميد إيستر فى داى مثيل سلفوكسيد (١ ملجم/ ملل).

٣- يضاف ١٠٠ ميكرولتر محلول بيوتين استر إلى IgG مع التقليب ويترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٤ ساعات ثم يديلز طول الليل ضد محلول الملحى للفوسفات ١, ٠ إم المحتوى على ٠٤, ٠٪ صوديوم أزيد عند درجة حرارة ٤° س.

٤- يضاف جلسرين إلى محلول بيوتينيلاتيد IgG إلى ٥٠٪ ثم يحفظ عند درجة حرارة - ٢٠° س.

الضوابط

١- يوزن ٢٠ جرام من اللحم المفروم وتوضع فى المعدية والمعدية (Stomach) لمدة ١٠ ثوان ثم يترك لمدة ساعة عند درجة حرارة الحجرة.

٢- يوضع الخليط فى حمام مائى مغلى لمدة ١٥ دقيقة ثم تدور فى جهاز الطرد المركزى عند ٠٠٠, ١٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ٤° س.

٣- تحضر مستخلصات لحوم الخيل والبقر والخنزير والغنم والغزلان والكانجارو والدجاج الرومى.

٤- تجهز المستخلصات غير المعامل حراريا ثم تعامل حراريا عند درجة حرارة ١٢٠°س ويستعاض عن الحرارة بالتعقيم لمدة ١٥ دقيقة.

العينات:

١- يضاف ١٠ مم ماء مقطر على ٥ جرام لحم مفرومة أو من لحوم معلبة فى كيس ويوضع فى المعدية والمعدية لمدة دقيقة .

٢- يخرج الكيس من المعدية والمعدة ويترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة.

٣- يدور المحلول فى جهاز الطرد المركزى عند ٥٦٠٠ لفة فى الدقيقة ثم يختبر السائل الطافى بأليسا.

★ الامتصاص المناعى والارتباط الانزيمى ELISA

١- تعيين أقصى تخفيضات للأجسام المغطاة وبيوتينيلاتيد الأجسام المضادة المرتبطة بالمعايرة لمستخلصات الضابط مستخدمًا زيادة الارتباط بالاستربتوفيدين بيروكسيديز بالكثافة البصرية عند طول موجة ٤١٤ نانومتر ناقص (-) الكثافة البصرية عند طول موجة ٤٩٢ نانومتر وأقل امتصاص هو ٠,٦٠٠ < للضابط المناظر، ٠,٠٦٠ > للضابط المتنافر.

٢- أقصى امتصاص لمحلول الكاشف ايه بى تى اس عند طول موجة ٤١٤ نانومتر وأقل امتصاص عند طول موجة ٤٩٢ نانومتر.

٣- يوجد فى كل قاع مسطح ٩٦ حفر، شرائح ميكروأليسا.

٤- يضاف ١٠٠ ميكولتر من IgG المخفف إلى ٠,٠٥م ترس - حامض الهيدروكلوريك (ذات اس هيدروجينى ٨,٤) والمحتوى على ٠,٠١٪ ميرثيولات.

٥- تقفل كل الشرائح وتوضع فى حجرة ذات رطوبة عالية عند درجة حرارة ٤° س لمدة ٢٤ ساعة ولا تتعدى أكثر من ٦ شهور إذا لم تفتح الشرائح.

٦- تغسل جميع شرائح الحفر ثلاث مرات بمحلول الغسيل المحايد ٠,٠٥م

فوسفات (ذات الأس الهيدروجينى ٧,٢) والمحتوى على ٠,٠٥٪ توين ٨٠ (Tween 80) (PBST).

٧- يضاف ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الملحى العادى داخل حفر الضابط.

٨- يضاف ١٠٠ ميكرولتر من مستخلص العينات والضابط كل عينة لها ٤ حفر.

٩- تغطى الشرائح وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة.

١٠- تغسل الشرائح بواسطة بى ب اس تى (PBST) ثلاث مرات (محلول ملحى من الفوسفات يحتوى على ٠,٠٥٪ توين ٨٠).

١١- يوضع ٢٥ ميكرولتر من محلول استربتافيدين بيروكسيديز المرتبط فى كل حفرة وتخفف بمحلول بى ب اس تى ١: ٢٠٠٠ والمحتوى على ١٠٪ من مصل الأرانب العادى الساخن غير النشط.

١٢- تغطى الشرائح وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة ثم تغسل ٤ مرات بالمحلول المحايد بى ب اس تى وتترك آخر غسلة فى الحفر وتغطى وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة.

١٣- يشفط المحلول المحايد بى ب اس تى ويضاف ٥٠ ميكرولتر من محلول المادة الخاضعة (substrate) وتتركب من - 0.4m M2,2 - azino - di - C 3 ethylbenzthiazoline - 6- sulfonate) and 1.3mM H_2O_2 in 0.1M NO_2 HPO_4 - citrie acid buffer ذات أس هيدروجينى ٤ لكل حفرة.

١٤- تغطى الشرائح وتحضن لمدة ٣٠ دقيقة ثم يضاف ٥٠ ميكرولتر من محلول الإيقاف ٠,٥إم حمض ستريك فى كل الحفر.

١٥- تقرأ الشرائح وتعين لها الكثافة البصرية (opttical density) فى جهاز قراءة

الامـتصاص المنـاعى عند طـول موجة ٤١٤ نانومتـر سالب (-) (Minus) الكثافة البصرية (OD) عند طول موجة ٤٩٢ نانومتر.

تحليل المعطيات:

١- الأجسام المضادة المتدفقة والمستخدمة فى طـريقة اليسا للدواجن معايرة حتى ١ : ٥٠٠ لـلأجسـام المـضـادة المغـطـاة، ١ : ٧٠ لـلأجـسام المـضـادة للبيوتينيلاتيد. أما الأجسام المضادة للخنزير فى طريقة اليسا معايرة حتى ١ : ٢٠٠٠ للأجسام المضادة المغطاة، ١ : ٩٠ للأجسام المضادة للبيوتيينيلاتيد.

٢- يتبين من جدول ١، ٢ خصوصية لحوم الخنزير والدجاج فى نظام اليسا كما يبين تأثير الحرارة على مستخلص الضابط (Control).

- ويتبـين من الجدول رقم (١) أنه لا يـوجد تداخل تفاعـلى مع مستـخلص اللـحوم الحمراء فـى الدواجن بـينما يـوجد تفـاعل قوى مـع مستخـلص الفراريج (Chicken) والرومى.
- كما يتـبين أيضًا أنه لا يوجد تـداخل تفاعلى مـع مستخلص لحـوم الخنزير المعاملة حرارية ومستخلصات الضوابط المتنافرة. بينما مستخلصات الضوابط للحوم الخنزير تتفاعل بقوة تحت أى ظروف كما هو مبين فى جدول (٢).
- يوجد تفاعل بسيط مع مستخلصـات لحوم الضوابط غير المعاملة حراريا من الخيل والـبقر والغنم والـغزلان مع الامتصـاص المناعى بالارتبـاط الانزيمى للحوم الخنزير.
- تفاعل المستخـلص يقل تفاعله قليلاً بالحـرارة التى تزيد عن ١٠٠°س لمدة ١٥ دقيقـة إلى ١٢٠° س لمدة ١٥ دقـيقة للامـتصاص المـناعى بالارتـباط الانزيمى (اليسا) للدجاج وأيضًا كذلك الخنزير.

جدول (٣) يوجد بـه نتيجة الامتصاص المـناعى بالارتباط الانزيمـى (اليسا) لمستخلصات العينة المعاملة حراريا (المطبوخة) والمعلبة.

- هذه الطريقـة حساسيـتها للحـوم الدواجن ١٢٦ جـزء فى المليون ولـلحوم الخنزير ٢٥٠ جزء فى المليون.
- جميع مستخلصات عينات الـضابط المختلفة المعاملة حراريا (١٠٠° س لمدة ١٥ دقيقـة) وجميع مـستخلصـات العينات الـتى درست وجد أن مـتوسط الكثافة الـبصرية (OD) هى ٠,٠٢٥ ومعـامل إنـحراف ٠,٠٠٩ (حـجم العينة ٤٠٠ حفرة) لعينات الدجاج ومتوسط ٠,٠٦١ ± ٠,٠٢١ (٥٠٠ حفرة) للخنزير.

أى عينة لها كثافة بصرية عالية مدروسة تحتوى لحوم دجاج أو لحوم خنزير، توضع هذه الـقيم على الأحداث الـرأسى فى الرسم ١، ٢ والمتـوافق مع لوح ١٠ ويمكن قراءة الكثافة البصرية (OD) على الأحداث الـسينى.

- هذه الطـريقة تكشف عن لحم الدجاج بـرقم معنوى هو ٠,٠٥٢ عند لوح تخـفيف ٣,٩ أو ١ : ٧٩٤٣ وهـذا يمثل ١٢٦ جزء فـى المليون وللخـنزير ٢٥٠ جزء فى المليون.

جدول (١)

مستخلص لحوم الدجاج الضابط فى اليسا(*) (mean ±SD) (٢٠ حفرة)

نوع الحيوان	غير معاملة حراريا	١٠٠° س لمدة ١٥ دقيقة	١٢٠° س لمدة ١٥ دقيقة
الحصان	٠,٠٦٨ ± ٠,٠١٥	٠,٠٢٤ ± ٠,٠٠٦	٠,٠٢٧ ± ٠,٠٠٧
البقر	٠,٠٨٦ ± ٠,٠٢١	٠,٠٢٤ ± ٠,٠٠٤	٠,٠٢٤ ± ٠,٠٠٧
الخنزير	٠,٠٣٥ ± ٠,٠٠٨	٠,٠٢٠ ± ٠,٠٠٤	٠,٠١٩ ± ٠,٠٠٣
الغنم	٠,٠٦٨ ± ٠,٠٢٠	٠,٠٢٢ ± ٠,٠٠٤	٠,٠٢٢ ± ٠,٠٠٣
الغزال	٠,٠٤٨ ± ٠,٠١٤	٠,٠٢٢ ± ٠,٠٠٨	٠,٠١٩ ± ٠,٠٠٤
الكانجارو	٠,٠٣٦ ± ٠,٠٠٥	٠,٠٤١ ± ٠,٠١٠	٠,٠٤٢ ± ٠,٠٠٩
الدجاج	٠,٧٧٥ ± ٠,٠٣٠	٠,٧٤٢ ± ٠,٠٣٨ (ب)	٠,٧٤٢ ± ٠,٠٣١
الرومى	٠,٦٧٦ ± ٠,٠٢٥	٠,٥٥٢ ± ٠,٠٢٣	٠,٥٠٥ ± ٠,٥٠٥

(*) الكثافة البصرية ٤١٤ - ٤٩٢ نانومتر - (ب) ٤٠ حفرة اختبار.

جدول (٢)

مستخلصات لحوم الخنزير الضابط فى اليسا(*) (mean ±SD) (٢٠ حفرة)

نوع الحيوان	غير معاملة حراريا	١٠٠° س لمدة ١٥ دقيقة	١٢٠° س لمدة ١٥ دقيقة
الحصان	٠,١٦٧ ± ٠,٠١٧	٠,٠٦٤ ± ٠,٠٠٤	٠,٠٨٨ ± ٠,٠١٦
البقر	٠,١٣١ ± ٠,٠٥٩	٠,٠٥٣ ± ٠,٠٠٩	٠,٠٤٨ ± ٠,٠١٢
الخنزير	٠,٧٩٥ ± ٠,٠٣٣	٠,٧١٩ ± ٠,٠٦٠ (ب)	٠,٦٨٣ ± ٠,٠٦٨
الغنم	٠,٢٤٣ ± ٠,٠١٨	٠,٠٦٢ ± ٠,٠٠٦	٠,٠٥٩ ± ٠,٠٠٩
الغزال	٠,١٣٠ ± ٠,٠٧٧	٠,٠٥٨ ± ٠,٠٠٧٧	٠,٠٥٦ ± ٠,٠٠٩
الكانجارو	٠,٠٥٤ ± ٠,٠٠٧	٠,٠٤٥ ± ٠,٠٠٦	٠,٠٤٧ ± ٠,٠٠٦
الدجاج	٠,٠٥٦ ± ٠,٠١٠	٠,٠٤٤ ± ٠,٠٠٨	٠,٠٤٢ ± ٠,٠٠٨
الرومى	٠,٠٥٩ ± ٠,٠٠٤	٠,٠٤٨ ± ٠,٠٠٧	٠,٠٥٢ ± ٠,٠١٠

(*) الكثافة البصرية ٤١٤ - ٤٩٢ نانومتر - (ب) ٣٨ حفرة اختبار.

جدول (٣)

مستخلص عينات اللحوم المطهية (المعاملة حراريا) للدجاج والخنزير
ولحوم المعلبات(*) (mean ±SD) ٢٠ حفر اختبار
(*) الكثافة البصرية (٤١٤ - ٤٩٢)

نوع الحيوان	دجاج اليسا	خنزير اليسا
• فارنكفورت		
الحصان	٠,٠٢٩ ± ٠,٠٠٢	٠,٠٧٦ ± ٠,٠١١
البقر	٠,٠٢٥ ± ٠,٠٠٦	٠,٠٦٠ ± ٠,٠٠٦
الخنزير	٠,٠٢٧ ± ٠,٠٠٢	٠,٧٥٢ ± ٠,٠٨٢
الغنم	٠,٠٣٦ ± ٠,٠٠٥	٠,١١١ ± ٠,٠٠٨
الغزال	٠,٠٤٠ ± ٠,٠٠٣	٠,١١٣ ± ٠,٠١٠
الدجاج	٠,٨٤٠ ± ٠,٠٤٥	٠,٠٦٥ ± ٠,٠٠٧
الرومى	٠,٦٦٤ ± ٠,٠٣٠	٠,٠٤٨ ± ٠,٠٠٤
• بولوجناز		
بقر	٠,٠٢٤ ± ٠,٠٠٤	٠,٠٦١ ± ٠,٠١١
خنزير	٠,٠٢٦ ± ٠,٠٠٣	٠,٧٥٤ ± ٠,٠٨٩
دجاج	٠,٨١٣ ± ٠,٠٥٧	٠,٠٧١ ± ٠,٠١١
رومى	٠,٠٣٦ ± ٠,٠٠٥	٠,٠٤٤ ± ٠,٠٠٦
• لحوم مفرومة ومضغوطة شرائح		
بقر	٠,٠١٤ ± ٠,٠٠٣	٠,٠٥٤ ± ٠,٠٠٤
خنزير	٠,٠١٥ ± ٠,٠٠٥	٠,٠٦٤٧ ± ٠,٠٢٣
دجاج	٠,٦٩١ ± ٠,٠١٩	٠,٠٤٦ ± ٠,٠٠٤
رومى	٠,٥٦٧ ± ٠,٠٣٣	٠,٠٦٣ ± ٠,٠٠٣

نوع الحيوان	دجاج اليسا	خنزير اليسا
• معلبات غذائية للأطفال		
بقر	٠,٠١٧ ± ٠,٠٠٥	٠,٠٥٣ ± ٠,٠٠٥
خنزير	٠,٠١٥ ± ٠,٠٠٥	٠,٤٦٣ ± ٠,٠٦٤
غنم	٠,٠٠٥ ± ٠,٠١٥	٠,٠٥١ ± ٠,٠٠٥
دجاج	٠,٤٤٦ ± ٠,٠٣٧	٠,٠٤٥ ± ٠,٠٠٣
رومى	٠,٥٩٣ ± ٠,٠٣٠	٠,٠٤٤ ± ٠,٠٠٤
• معلبات منتشرة		
بقر	٠,٠٢٠ ± ٠,٠٠٢	٠,٠٥٣ ± ٠,٠٠٢
خنزير	٠,٠٢٠ ± ٠,٠٠٢	٠,٦٥٠ ± ٠,٠٤٥
دجاج	٠,٤٤٥ ± ٠,٠٢٧	٠,٠٥٣ ± ٠,٠٠٦

BERGER ET AL.: J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. (VOL. 71, NO. 2, 1988)

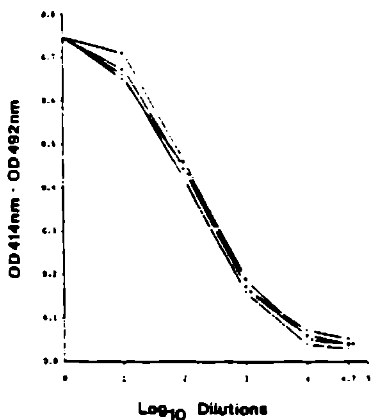


Figure 1. Effect of diluting chicken control extract (100°C for 15 min) in control extracts (100°C for 15 min) of horse (◆), beef (*) and pork (+) and beef frankfurter sample extract (⊕).

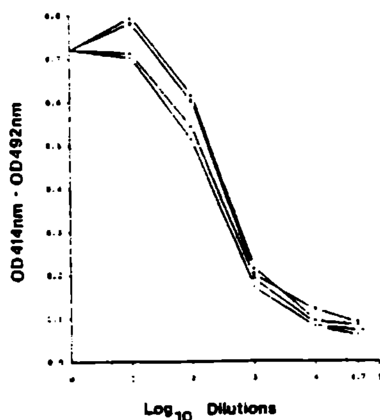


Figure 2. Effect of diluting pork control extract (100°C for 15 min) in control extracts (100°C for 15 min) of horse (◆), beef (*) and chicken (+) and beef frankfurter sample extract (⊕).

شكل (١)

المراجع:

(1) Fugate, H. G., && Penn, S.R. (1971) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 54, 1152-1156.

(2) Whittaker, R. G., Spencer, T. L., && Copland, J. W. (1983) *J. Sci. Food Agric.* 34, 1134-1148.

(3) Sinclair, A. J., & Slattery, W. J. (1982) *Aust. Vet. J.* 58, 79-80.

(4) King, N. L. (1984) *Meat Sci.* 11, 1-14.

(5) Milgrom, F., Tuggac, Z. M., & Witebsky, E. (1964) *J. Immunol.* 93, 902-909.

(6) Hayden, A. R. (1981) *J. Food Sci.* 46, 1810-1813.

(7) Kang'ethe, E. K., Lindquist, K. J., & Gathuma, J. M. (1985) in *Biochemical Identiflcation of Meat Species*, R. L.S. Patterson (Ed.) Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, NY, pp. 129-144.

(8) Manz, J. (1985) *Fleischwirtsch* 65, 497-499.

(9) Lowry, O. H., Rosenbrough, J. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

(10) Weimer, H. E., Mehl, J. W., && Winzler, R. J. (1950)*J. Biol. Chem.* 185, 651-568.

(11) Wilchek, M., & Bayer, E. A. (1984) *Immunol. Today* 5, 39-43.

(12) Chaiet, L., & Wolf, F. J. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 106, 1-5.

التعرف على اللحوم بجهاز الكروماتوجراف السائل

Liquid Chromatographic Identification of Meats

SAMY H. Ashoor, Woodrow C. Monte and Philip G, Stiles

J. Assoc. off Anal., Chem. Cvol, 71. No. 2, 1988.

التعرف على اللحوم بجهاز الكروماتوجراف السائل (LC)

Liquid Chromatographic Identification of meat

أساس الطريقة:

لحوم البقر الخام، الخنزير، البتلو، الغنم، الدجاج، الرومى والبط يمكن التعرف عليها بطريقة جهاز الكروماتوجراف السائل.

عينات اللحوم المفرومة فى الماء يفصل منها البروتين المذاب بواسطة جهاز الكروماتوجراف السائل، قطعيات اللحوم وأجزائها من نفس النوع تشابه الصور الجانبية المختلفة للكروماتوجراف وتختلف فقط كميا. بينما نتائج قطعيات اللحوم أو الأجزاء المختلفة الأنواع الناتجة فى اختلاف الصور الجانبية للكروماتوجراف.

الاختلاف الكمى أو الكيفى للكروماتوجراف لجميع أنواع اللحوم والمستخدمة للتعرف عليها. طريقة جهاز الكروماتوجراف السائل تطبق فقط على اللحوم الطازجة والمجمدة.

وهذه طريقة بسيطة وسريعة ومناسبة ويمكن استخدامها للتعرف كيفيا على أنواع اللحوم فى اللحوم المفرومة غير المطهية.

وهذه الطريقة باستخدام جهاز الكروماتوجراف السائل تتطلب حوالى ساعة تقريبًا للحصول على التحليل الكلى.

الطريقة :

★ الاجهزة:

أ - جهاز الكروماتوجراف السائل Liquid chromatograph

ب- البيانات المعدلة Data module

جـ- أعمدة الكروماتوجراف السائل LC Column

د- مفرمة Blender

و- جهاز كاشف Detector

★ الكواشف:

أ- اسيتوت ترين.

ب- ماء مقطر متأين.

جـ- تراى فلورو حمض الاستيك (TFA).

د- الطور المتحرك للكروماتوجراف السائل (مذيب أ، ١ , ٠ ٪ من تراى فلورو حمض الاستيك فى الماء، مذيب ب، اسيتونتويل مضاف إليه الماء وتراى فلورو حمض الاستيك (٩٥ + ٥ + ١ , ٠) يستخدم الخط المدرج والمبرمج من ٣٧ - ٦٠ ٪ للاسيتونتريل فى ٥٥ دقيقة، ١٥ دقيقة.توازن عند معدل الانسياب ٥ , ١ ملل/ الدقيقة.

هـ- مصل الألبيومين للفصيلة البقرية (BSA)

و- صوديوم أزيد.

★ العينات:

أ- اللحوم من محلات الجزارة (لحوم بقرى، خنزير، غنم؛ بتلو من أماكن مختلفة مثل الصدر، الضلوع، الظهر والأرجل).

ب- الدواجن (لحوم كل الدجاج والرومى، البط) من المحلات المحلية وتقطع إلى صدر وأجنحة وأفخاذ وأرجل.

★ الاستخلاص المائى للبروتينات الذائبة:

- تخلى اللحوم من العظم، الدهن، الجلد (للدجاج).
- تفرم اللحوم.
- يوزن ٢٥ - ٥٠ جرام من اللحوم المفرومة.
- تمزج أوزان اللحوم المفرومة بضعفها ماء مقطر فى خلاط لمدة ٥ دقائق.
- ترشيح اللحوم الممزوجة بالماء.
- يضاف محلول صوديوم أزيد.
- التركيز النهائى للراشح هو ٠١, ٪.
- يرشح المحلول النهائى للراشح من خلال ورق ترشيح ٤٥, ٠ ميكرولتر فى قوارير زجاجية للكروماتوجراف السائل للتحليل.

★ التحليل بواسطة الكروماتوجراف السائل:

- يحقن ٥ ميكرولتر من محلول BSA فى LC ثلاث مرات ويعين متوسط وقت الانحباس.
- يحقن ١٠ - ٢٥ ميكرولتر من ترشيح اللحوم المفرومة فى نظام LC ويعين وقت الانحباس نسبيًا (نسبيًا إلى قمة BSA) والنسبة المئوية لمنطقة القمم الكبيرة.
- تحليل LC مختلط من المزيج. يحقن حجم مساوى من اثنين من المزيج متتابعين ويعين نسبة وقت الانحباس والنسبة المئوية لمنطقة جميع القمم.
- لتعيين الأنواع الأساسية للقمم فى مخلوط الكروماتوجراف باستخدام معلومات متحصل عليها من الكروماتوجراف القياسى.

★ تحضير خليط من اللحوم والدواجن المجهولة:

تستخدم طريقة LC فى تعيين ٢٠ مخلوط مجهول من اللحوم المخلوطة المختلفة بلحوم الدواجن لتكون التركيب الآتية ٥، ١٠، ٥٠٪ لحوم خنزير فى اللحوم البقرية، ٣٠٪ لحم بتلو فى لحوم بقرية، ٥، ٥٠٪ لحوم خنزير فى لحوم بتلو، ١٠، ٥٠٪ لحوم خنزير فى لحوم دجاج، ٥، ١٥، ٧٥٪ لحوم دجاج فى لحوم الرومى، ١٠، ٦٠٪، لحوم بط فى لحوم دجاج، ٥، ٥٠٪ لحوم بط فى لحوم رومى. هذه المخاليط المدونة تحضر كما شرحت أعلاه ويعين كل نوع بواسطة LC.

النتائج والمناقشة:

متوسط الوقت الاحتباسى للـ BSA كان ١٥,٨ ± ٠,٧ دقيقة حينما يكون الحقن مختلط الـ BSA تتداخل مع قمم معظم عينات اللحوم. بينما إذا كان الحقن منفصل يستخدم قياس خارجى. وللتعرف على الكميات المختلفة للكروماتوجرام أسهل وأدق.

المعلومات المتحصل عليها من تحليل LC لمختلف اللحوم وأنواع الدواجن على حدة ومختلطة فى جدول ١-٦ وشكل ١-٣ النتائج تدل على القطعيات أو الأجزاء من نفس الأنواع تملك نفس الكروماتوجرام مع القمم والتى لها نفس أوقات الاحتباس نسبيًا حتى لو اختلفت المناطق. الكميات المتماثلة من القطعيات أو الأجزاء من نفس الأنواع والتى استخدم فيها طريقة LC وطبقت على جميع عينات اللحوم من مختلف القطعيات أو الأجزاء. البيانات تبين أن كل أنواع لها قمم خاصة قد تستخدم فى الكشف وكمية الأنواع فى منتجات اللحوم والدواجن. بينما تطبق طريقة LC فقط على اللحوم الطازجة والمجمدة كروماتوجرام اللحوم المعاملة حراريا غير واضح فى اللحوم الطازجة والمجمدة

ولذلك لا تستخدم فى التعرف عليها. واضح أن الحرارة تغير من طبيعة البروتين الذائب فى الماء. التجميد لمدة ٦ شهور عند درجة حرارة - ٤٠° س لا تغير الكروماتوجرام للأنواع المدروسة. جميع قطعيات اللحوم المستخدمة فى الدراسة لها قمتين. مخصوصتين مع أوقات الاحتباس نسبيًا ٠,٦١ ، ١,٤٥ ٠ هذه القمتين الموجودة البقرية المختلطة مع جميع اللحوم الأخرى (جداول ١ ، ٤ وأشكال ١ ، ٣). جميع الأنواع المختبرة، فقط لحوم البتلو والغنم لها قمة بارزة عند وقت احتباس ٠,٦١ كما يوجد أنواع لها قمة بارزة عند وقت احتباس ١,٤٥ كما فى اللحوم. وجود قمتين بارزتين تميز اللحوم والتى استخدمت فى التعرف الصحيح على اللحوم فى مختلط اللحوم غير المعروفة والتى تمت فى المختبر.

القمم البارزة للخنزير لها أوقات احتباس نسبيًا من ١,٢٦ ، ١,٧٢ بينما قمة وقت الاحتباس ١,٧٢ تحلل فى جميع كروماتوجراف الخنزير (جدول ١ ، ٥ ، وأشكال ١ ، ٣) ولقد اختيرت للكشف عن لحوم الخنزير فى مخاليط اللحوم المجهولة والمجهزة فى المعمل. والبط فقط عن جميع الأنواع له وقت احتباس ١,٧٢ بينما البط له قمة أخرى بارزة عند وقت احتباس ١,٧٩ وهى غير موجودة فى لحوم الخنزير. قطعيات الغنم لها قمم خاصة عند أوقات احتباس نسبيًا ٠,٦١ ، ١,١٠ ، ١,٢١ ، ١,٢٢٩ (جداول ٢، ٤ وأشكال ١ ، ٣).

استخدام القمة بوقت احتباس نسبى ١,٢٩ ، ويتعرف على لحوم الأغنام فى اللحوم المخلوطة والمجهولة، فقط قطعتين من لحوم البتلو والموجودين من المحلات الموجودة من الكتف والخصر. هذه القطعيات تمنح الكروماتوجرام مثل الموجود باللحوم (جداول ١ ، ٢ ، ٤ وأشكال ١ ، ٣) بينما لحوم البتلو لها قمة خاصة عند وقت احتباس نسبى ١,٢٦ ولا يوجد لها قمة مع وقت احتباس

١,٤٥ ، خاص باللحوم البقرية. ويمكن التعرف على لحوم البتلو فى خليط اللحوم المجهولة.

تحليل لحوم الدجاج والرومى والبط بطريقة LC تمنح أنواع قمم خاصة إذا كانت تستخدم فى التعرف الواقعى الموثوق به (جداول ٣، ٦ وأشكال ٢، ٣) جميع لحوم الدواجن المجهولة والمحضرة فى المعمل يمكن التعرف عليها بالضبط وصح باستخدام قمم خاصة بأوقات احتباس نسبيًا ١,٦ للدجاج، ١,١٠ للرومى، ١,٢٦ للبط (جدول ٦ وشكل ٣).

العوامل مثل العمر والجنس للحيوان واختلاف القطعان فى داخل النوع الواحد والمناطق الجغرافية واختلاف الفصول السنوية قد تؤثر فى الأنواع للصورة الجانبية (Profite) بينما هذه الطريقة لها قدرة كبيرة فى التعرف على لحوم ولحوم الدواجن المختلفة ببساطة وسرعة.

جدول (١): تحليل قطعيات قطاعى من لحوم الأبقار والخنازير بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصل الالبيومين البقرى (RRT)	b% للمساحة الكلية للحوم الأبقار				b% للمساحة الكلية للحوم الخنزير			
	رقبة Chuk	ضلع Rib	خصر Round	قطع لحم مستديرة Round	كتف Shoulcher	ضلع Rib	خصر Loin	فخذ Ham
٠,٦١	١٠,٨	١٢,٤	١٢,٣	١٦,٠٠	٢,٠٤	٣,١٨	٣,٨٣	٣,٥٠
١,٠٠	٢,٠٠	٢,٦٧	٢,٥٠	٢,١٠	—	—	—	—
١,١٠	٢,١٠	٤,٨٩	٢,٦٠	٢,٠٠	١٠,٨	٢٢,١٢	٢,٣٣	٢,٠٠
١,١٦	٧,٦٥	١٤,٣	١٦,٧	١٢,٠٠	٤,١٢	٢,٠٠	٤,١٧	٣,٢٥
١,٢١	١٣,٦	١٠,٧	١٠,٢٢	٨,٣٨	١٢,٨	٢٠,٣	١١,٣	٢١,٤
١,٢٦	—d	—	—	—	٣٢,٨	١٩,١	٢٥,٧	١٧,٢
١,٢٩	٣,٧٨	٤,٥٦	٢,٧٠	٢,٥٠	—	—	—	—
١,٣٨	—	—	—	—	٢,٥٠	٨,٧٩	٥,٣٣	٤,٢٠
١,٤٥	١٢,٩	١٠,١	١١,٢	١٤,٩	—	—	—	—
١,٧٢	—	—	—	—	٦,٤٦	٩,٠٥	٩,٥٠	١١,١
١,٧٩	٤,٢٢	٦,٤٤	٦,١٠	٤,٦٢	—	—	—	—
١,٨٨	٢,٢٤	٢,٠٠	٢,٩٠	٢,٦٣	—	—	—	—
٢,٠٠	—	—	—	—	٢,٤٨	٣,٣٧	٢,٨٣	٣,٤٠
٢,١٠	—	—	—	—	٦,٣٥	٤,٦٣	٥,٦٧	٤,٤٢٢
٢,٢٢	٤,٩٢	٤,٤٤	٤,٨٠	٣,٢٥	٤,٣٨	٧,٦٦	٨,١٧	٨,١٧
٢,٣٧	٦,٧١	٥,٥٦	٥,٦٠	٦,٧٥	—	—	—	—
٢,٥٩	—	—	—	—	٣,٧٥	٦,٣٢	٦,١٧	—
٢,٦٥	—	—	—	—	٣٠٥٤	٧,٥٨	٧,١٧	١١,٣
٢,٧١	٤,٧٧	٢,٩١	٤,٧٤	٢,٨٩	—	—	—	—
٢,٧٧	٦٢١	٣,٤٢	٤,٢٢١	٤;٧٢٢	٣,٣٣	٤,٨٤	٥,٣٣	٦,٣٣
٢,٨٦	٥,٧١	٨,٦٧	٩,٠٠	٨,٢٥	—	—	—	—

* Relative to retention time of BSA Peak.
* Average of 2 determinations.
* Major characteristic peaks of species are underlined.
* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.
* Peak overlapped with another.

جدول (٢): تحليل قطعيات قطاعى من لحوم البتلو والغنم بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصل الالبيومين البقرى (RRT)a	% b للمساحة الكلية للحوم الأبقار		% b للمساحة الكلية للحوم الغنم			
	كتف Shoulder	قطع مستديرة Round	كتف Shoulder	ضلع Rib	خصر Loin	رجل Leg
,٦١	٦,٢٨	٥,٢٦	١١,١	١١,١	١١,٤	١٣,٨
١,٠٠	٣,٢٤	٣,٤٧	—	—	—	—
١,٠٥	—c	—	٤,٣٠	٥,٣٨	٣,٠٢	٣,١٦
١,١٠	—	—	١٧,٥	١٢,٩	١١,٦	١٨,٦
١,١٦	١٨,٧d	١٨,٨	—e	٤,٩٥	٨,١٠	—e
١,٢١	٦,٠٧	٦,٤١	٢٤,٣	١٤,٠٠	٩,٠٥	١٤,٤
١,٢٦	١٠,٧	١٠,٠٠	—	—	—	—
١,٢٩	٣,٢٤	٣,٢١	١٤,٠٠	١٨,٤	١٩,٥	١٩,٧
١,٣٨	٣,٨٠	٣,٧٩	٥,٥٦	٤,٨٤	٦,٦٧	٣,٨٠
١,٦٦	٦,٣٣	٥,٧٣	—	—	—	—
١,٧٩	٣,٩٥	٤,٠٠	—	—	—	—
٢,٢٢	٦,٣٣	٥,٩٤	—e	٣,٢٣	٣,٣٣	٢,٩١
٢,٢٧	٦,٤٨	٧,١٥	٨,٧٣	٥,٧٠	٦,٣٤	٥,٢٠
٢,٧١	٤,٣٥	٤,٧٣	—	—	—	—
٢,٧٧	٤,٤٥	٤,٣٦	٤,٩٢	٤,٥٢	٥,٥٦	٤,١٨
٢,٨٦	٩,٦٧	٩,٦٧	—	—	—	—

* Relative to retention time of BSA Peak.
* Average of 2 determinations.
* Major characteristic peaks of species are underlined.
* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.
* Peak overlapped with another.

جدول (٣) تحليل قطعيات قطاعى من لحوم الدجاج الرومى والبط بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصل الالبيومن البقرى (RRT)a	%b للمساحة الكلية للحوم الدواجن				%b للمساحة الكلية للحوم الرومى				%b للمساحة الكلية للحوم البط			
	صدر Brest	جناح Wing	فخذ Thigh	رجل Leg	صدر Brest	جناح Wing	فخذ Thigh	رجل Leg	صدر Brest	جناح Wing	فخذ Thigh	رجل Leg
١,١٠	—c	—	—	—	٢٠,٠٠	٢٤,١	١٣,٠٠	١٤,٢	—	—	—	—
١,١٦	٣٠,٠٠d	٢٨,٤	٢٠,٣	٢١,٥		—	—	—	—	—	—	—
١,٢٦	—	—	—	—	٢,٠٠	—e	٢,٦٠	٣,٣٠	٢٦,٧	٢٣,٧	٢٢,٥	٢٢,٤
١,٤٠	—	—	—	—	١٨,٨	١٨,٢	٧,٩٠	١١,٢	—	—	—	—
١,٤٥	١٤,٥	١٨,٦	٣٠,٨	٣٥,٣	١٦,٧	١١,٥	٢١,٤	٣٥,٥	٧,٣٣	١٠,٦	—e	—e
١,٤٨	—	—	٢٢٢,٩	—	—	—	—	—	٧,٥٠	١١,٠٠	٢٨,٦	٢٤,٧
١,٥٢	١٦,٧	٧,٨٦		٧,٦٤	٨,٩٣	١٣,٧	١٤,٠٠	٩,٧٢	١٨,٣	١١,٠٠	١٠,٨	١٢,٩
١,٦٦	٣,٨٧	٢,٨٦	٢,٢٧	٢٢,٠٠	٣,٦٤	٢,٨٢	٢,٠٠	٢,٠٠	—	—	—	—
١,٧٢	—	—	—	—	—	—	—	—	٧,٦٧	٨,٤٣	٥,٣٠	٤,٩١
١,٧٩	—	—	—	—	—	—	—	—	٥,٦٧	٥,٨٨	٤,٣٤	٢,٨٢
٢,١٠	٨,٠٠	٧,١٤	٤,١٠	٦,٠٠	٥,٠٠	٥,٢٥	٤,٥٧	٤,١٠	٦,٦٧	٦,٨٦	٤,١٠	٤,٩١
٢,١٧	—	—	—	—	—	—	—	—	٣,٨٣	٢,٥٢	٢,٥٣	٢,٠٠
٢,٤٠	٦,٨٠	٨,٢٩	٤,٨٥	٦,١٨	٥,١٥	٧,٥٥	٤,٨١	٥,٣٨	—	—	—	—
٢,٤٦	٦,٢١	٥,١٤	٤,١٠	٣,٦٤	٥,٩١	—e	—e	—e	٣,١٧	٥,١٠	٤,٨٢	٥,٠٩
٢,٥٩	—	٦,١٤	٢,٠٠	٥,١٠	—	—	—	—	—	—	—	—
٢,٦٥	١١,٣	٧,٧١	٦,٢١	٨,١٨	٦,٥١	١٠,١	٧,٠٠	٣,٥٠	٩,١٧	١٠,٨	١٠,٦	٩,٦٥

* Relative to retention time of BSA Peak.
* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.
* Peak overlapped with another.
* Average of 2 determinations.
* Major characteristic peaks of species are underlined.

جدول (٤): تحليل لحوم الأبقار المختلطة بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصل الالبيومين البقرى (RRT)a	b% للمساحة الكلية						
	Beef بقرى	Beef بقرى pork خنزير	Beef بقرى veal بتلو	Beef بقرى Lamb غنم	Beef بقرى chicken دجاج	Beef بقرى lurkey رومى	Beef بقرى Duk بط
,٦١	١٠,٨٢	٦,٧٥	٧,١٧	١١,٨	٥,٥٤	٧,٠٤	٨,٦٨
١,٠٠	٢,٠٠	—	٣,٩٤	—	—	—	—
١,٠٥	٢,١٠	—	—	٥,٢٩	—	١٢,٠٠	—
١,١٠	٧,٦٥	١٣,٥٠	٢٥,٧	٤,٦٤	١٩,٧	٤,١٣	٧,٣٦
١,٦	١٣,٦	١٤,٩	١٢,٠٠	١٧,٦	١٠,٢	٦,٧٧	١٧,٠٠
١,٢٦	٢,٩٨	١٨,٤	٤,٣٠	٢,٠٧	—	—	١٠,٢
١,٢٩	٣,٧٨	—	—	٩,٠٠	٢,٥٤	٥,٢٠	—
١,٣٨	—	٢,٣٤	—	٥,٥٠	—	—	—
١,٤٥	١٢,٩	٨,٠٥	٧,٢٤	٨,٠٧	٩,٤٠	١٠,٥	١٨,٦
١,٥٢	—	—	—	—	٧,٤٠	١٢,١	٤,٩٤
١,٦٦	—	—	—	—	٣,٠٨	٢,٠٠	—
١,٧٢	—	٣,٤٨	—	—	—	—	—
١,٧٩	٤,٢٢	—	٣,٥٤	٥,٠٧	—	٢,٩١	٥,٠٣٤
١,٨٨	٢,٢٤	—	٣,١٥	—	—	—	—
٢,١٠	—	٢,٢٧	—	—	٣,٥٥	٢,٧٤	—
٢,١٧	—	—	٣,٥٤	—	—	—	—
٢,٢٢	٢,٩٢	٣,٠٠	٨,٥٠	٤,٢٩	٣,٢٨	٢,٥٤	٢,٥٧
٢,٢٧	٦,٧١	٣,٧٧	—	٥,٤٣	٣,٤٢	٣,٤٤	٣,٨٩
٢,٤٠	—	—	—	—	٣,١٣	—	—
٢,٤٦	—	—	—	—	٢,٥٩	٢,٤٣	—
٢,٥٩	—	٢,١٤	—	—	—	—	—
٢,٦٥	—	٢,٢٧	٢,٧٦	—	—	—	—
٢,٧١	٤,٧٧	٢,٣٤	—	٣,٦٦	٢,٠٣	٢,٣٨	—
٢,٧٧	٦,٢١	٥,٥٨	٧,٧٢	٤,٠٠	٣,٤٧	٣,٦٠	٤,٢
٢,٨٦	٥,٧١	٣,٣١	٧,٠٥	٥,١٤	٣,٠٨	٣,٣٩	٣,٩٦

* Relative to retention time of BSA Peak.
* Average of 2 determinations.
* Major characteristic peaks of species are underlined.
* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.

جدول (٥): تحليل لحوم الخنزير المختلطة بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصل الالبيومين البقرى (RRT)a	٪ للمساحة الكلية					
	الخنزير	خنزير وبتلو	خنزير وغنم	خنزير ودواجن	خنزير وورمى	خنزير وبط
,٦١	٢,٠٤	٣,١٣	٦,٩٧	—	—	—
١,٠٠	—	٢,٧٢	—	—	—	—
١,٠٥	—	—	٢,٦٩	—	—	—
١,١٠	١٠,٨	—	٦,٢٧	—	٢١,٨	٤,٤٢
١,١٦	٤,١٢	٢٧,٠٠	١٤,٨	٢٢,٠٠	—	—
١,٢١	١٢,٨	—	—	٦,٨٠	٧,٧٦	٢٥,٩
١,٢٦	٣٢,٨	٣٠,٢	٣١,٠٠	١٦,٢	١٧,٧	٢٢,٢
١,٣٨	٢,٥٠	٢,٨٠	٦,٦٧	—	—	—
١,٤٥	—	—	—	١١,٢	١١,٣	٦,٩٧
١,٥٢	—	—	—	١٠,٣	٥,٣٣	٦,٠٦
١,٦٦	—	—	٣,٦٦	٢,٨٦	٢,٣١	—
١,٧٢	٦,٤٦	٤,٦٣	٣,٩٨	٣,٨٦	٢,٩٣	٥,٩٦
١,٧٩	—	٣,٣٨	—	—	—	٢,٢٢
٢,٠٠	٢,٤٨	٣,٨٣	٤,٧٦	٢,٢٤	—	—
٢,١٠	٦,٣٥	٦,٠٠	—	٦,٣٩	٢,٤١	٣,٢٣
٢,١٧	—	—	—	—	—	٢,١٤
٢,٢٢	٤,٣٨	٢,٠٠	٦,٤٧	—	—	٢,١٤
٢,٤٠	—	—	—	٣,٦١	—	—
٢,٤٦	—	—	٢,٠٧	٣,٢٠	٣,١٣	—
٢,٥٩	٣,٧٥	٤,١٤	٢,٠٠	—	٣,٥٤	—
٢,٦٥	٣,٥٤	٣,٣٠	٤,٢٣	٨,٨٤	٨,٣٦	٧,٤٧
٢,٧٧	٣,٣٣	٣,٥٤	٢,٠٤	—	—	٢,٣٢

* Relative to retention time of BSA Peak.
* Average of 2 determinations.
* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.
* Major characteristic peaks of species are underlined.
* Peak overlapped with another.

جدول (٥): تحليل لحوم الخنزير المختلطة بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصل الالبيومين البقرى (RRT)a	٪ للمساحة الكلية					
	الخنزير	خنزير وبتلو	خنزير وغنم	خنزير ودواجن	خنزير ورومى	خنزير وبط
١,١٠	—	٢٠,٠٠	٨,٠٠	—	—	١٤,١
١,١٦	٣٠,٠٠	—	١٨,٩	—	١٨,٥	—
١,٢٦	—	٢,٠٠	—	٢٦,٧	١٢,٢	١٢,٣
١,٤٥	١٤,٥	١٦,٧	٢٢,٨	٧,٣٣	١٦,٢	٨,١٦
١,٤٨	—	—	—	٧,٥٠	٧,٩٣	—
١,٥٢	١٦,٧	٨,٩٣	١٣,٣	١٨,٣	٨,١٢	—
١,٦٦	٣,٨٧	٣,٦٤	٤,٣٨	—	٢,٤٥	٢,٥٢
١,٧٢	—	—	—	٧,٦٧	٢,٤١	٢,٤٣
١,٧٩	—	—	—	٥,٦٧	٢,٩٨	٢,٣٣
٢,١٠	٨,٠٠	٥,٢٥	٨,٨٦	٦,٦٧	٧,١٦	٧,٧٧
٢,١٧	—	—	—	٣,٨٣	—	—
٢٢,٤٠	٦,٨٠	٧,٥٥	٥,٨١	—	٤,٤٠	٤,٨٥
٢,٤٦	٨,٢١	—	٤,٥٧	٣,١٧	٤,١٤	٤,٥٦
٢,٦٥	٦١,٣	٦,٥١	٩,٢١	٩,١٧	١٠,٧	١١,٨

* Relative to retention time of BSA Peak.
* Average of 2 determinations.
* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.
* Major characteristic peaks of species are underlined.

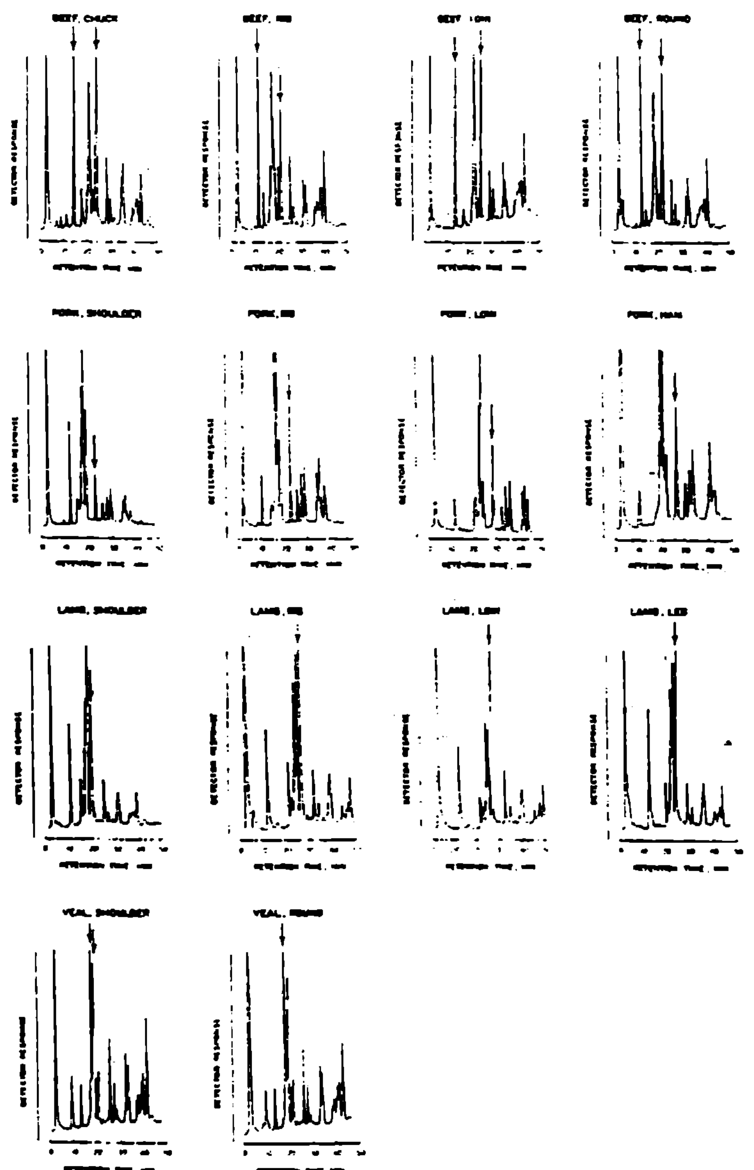


Figure 1. Chromatograms of beef, pork, lamb, and veal cuts. Arrows indicate species-specific peak(s).

شكل (١)

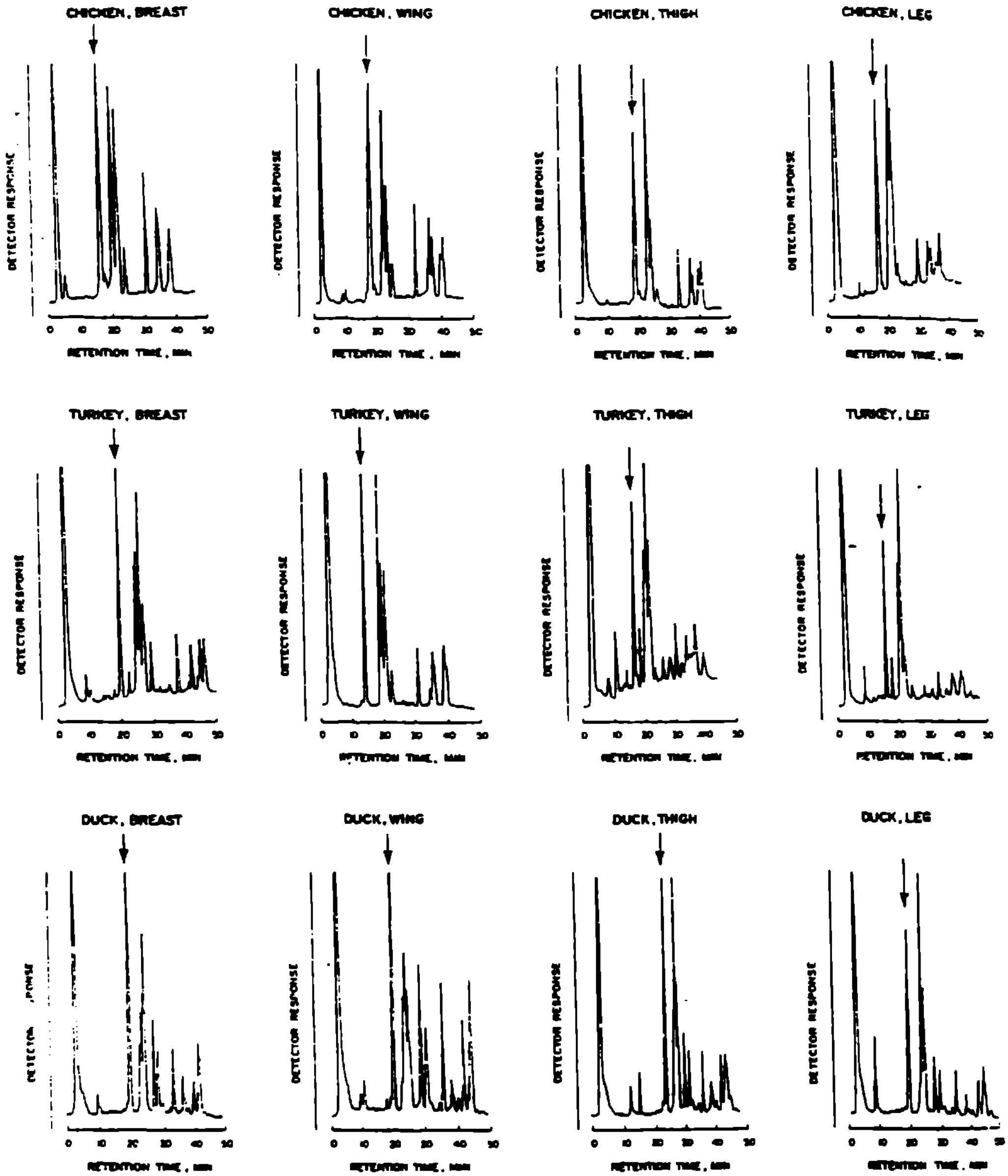


Figure 2. Chromatograms of chicken, turkey, and duck parts. Arrows indicate species-specific peak(s).

شكل (٢)

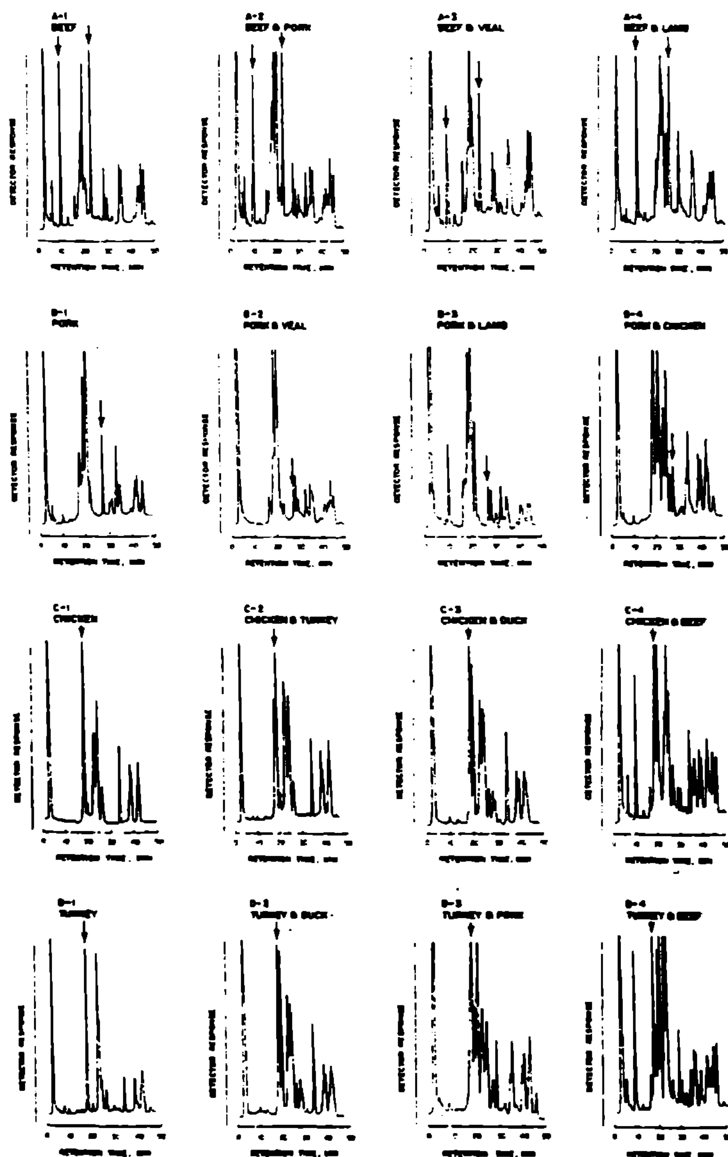


Figure 3. Chromatograms of meat and poultry mixtures. Arrows indicate peak(s) specific to beef, pork, chicken, and turkey.

شكل (٣)

المراجع:

(1) Thompson, R. R. (1961) *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **44**, 787-787.

(2) Scopes, R. K. (1968) *Biochem. J.* **107**, 139-150.

(3) Hoyem, T., & Thorson, B. (1970) *J. Agric. Food Chem.* **18**, 737-739.

(4) Babiker, S. A., Glover, P. A., & Lawrie, R. A. (1982) *Meat Sci.* **5**, 473-477.

(5) Kim, H., & Shelef, L. A. (1986) *J. Food Sci.* **51**, 731 et seq.

(6) Kaiser, K. P., Matheis, G., Kmita-Durrman, C., & Belitz, H. D. (1981) *Sci. Tools* **28**, 5-7.

(7) King, N. L., & Kurth, L. (1982) *J. Food Sci.* 47, 1608-1612.

(8) Sinclair, A. J., & Slattery, W. J. (1982) *Aust. Vet. J.* **58**, 79-80.

(9) Hayde, A. R. (1977) *J. Food Sci.* **42**, 1189-1192.

(10) Hayde, A. R. (1977) *J. Food Sci.* **43**, 476 et seq.

(11) Hayde, A. R. (1977) *J. Food Sci.* **44**, 494-500.

(12) Cook, H. R., && Sturgen, J. D. (1966) *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **49**, 877-880.

(13) Saeed, T., Abu-Dagga, F., & Abdul-Rahman, H. (1986) *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **69**, 999-1002.

(14) Medina, M. B., & Philips. J. G. (1982) *J. Agric. Food Chem.* **30**, 1250-1253.

طريقة اليسا المعدلة للتعرف على اللحوم الطازجة باستخدام مضادات الأمصال الخام وثابتة التفاعل المناعى

A Modified Indirect ELISA procedure for Row Meat Speciation using crude. Anti-speices, Antisera and stabilised Immunoreagents.

Sheila J. et al AFRC Institute of Food Research, Bristol Laboratory, Langford, Bristol BS 187 Dy 1985.

طريقة اليسا المعدلة للتعرف على اللحوم الطازجة باستخدام مضادات الأمصال الخام وثابتة التفاعل المناعى

أساس الطريقة:

طريقة الارتباط الانزيمى بـالامتصاص المناعى ELISA معروفة جـيدًا كأداة لتشخيص القيمة الغذائية فى المختبرات (Food quality contral).

وعلـى ذلك أن نوع الاختـبار المنـاعى يعتـمد أساسًا عـلى اتخاذ الأجـسام المضادة مع الانتيجينات عند سطح الامتصـاص المناعى مكونا مركب خليط يظهر خصيصًا بدرجة عالـية ومطلوب التعرف أو تعيين مكونات هـذا الخليط المشترك مثل مستخـلصات الغذاء فى مساحة التـعرف على نوع اللحوم المختلـفة بطريقة اليسا (ELISA) وهى غير مـعتمدة أساسًا على تعـيين نوع اللحوم غير المـعاملة حراريا.

الطريقة غير المباشرة لطريقة ELISA

متعـددة الاستخدامـات إلى حد بعـيد وتستـخدم فى صورة تحـليل مبـسط لمختلف اللحوم غير المصنعة ومنتجات اللحوم الخام.

التجربة Experimental

★ تحضير مضادات الأمصال لمضادات الأنواع المترسبة:

Preparation of preciptating anti-species antisera

١- تحصـين (immunised) الغـنم ضد أمـصال البـيومين الأبـقار (BSA) والخيول (ESA) والخنازير (PSA).

٢- تجمع مضادات الأمصال تبعًا للطريقة المشروحة بواسطة العالم Mageau وآخرون مستخدمًا الانتشار المناعى للأجارجيل.

٣- تختبر استجابة مضادات الأجسام ضد الانتيجينات النقية فى محلول مائى (١ ملجم/ ملل).

٤- المصل الطبيعى يخفف حتى ٨ أضعاف فى محلول فسيولوجى.

٥- لم يشاهد تداخل تفاعلى متنافر معين واضح لهذه الطريقة.

٦- خطوط الترسيب يتحصل عليها فقط ضد الأنواع المتماثلة (homologous).

★ تحضير أقراص مضادات الأجسام الثابتة:

Preparation of stabilised antibody discues

١- مضادات الأمصال لمضادات الأنواع الثابتة توضع على أقراص ذات قطر ٦ ملم من ورق الترشيح .

٢- طريقة العالم Magau وآخرون طورت كما يأتى ٢٠ ميكرولتر من كل من مضادات الأمصال لمضادات الأنواع (غير مخففة) توضع على أقراص ورقية وتفرد على طبق بتردش مسطح.

٣- بعد التجفيف السطحى فى درجة حرارة الغرفة لمدة ١-٢ ساعة للأقراص تجمد - تجفف طول الليل تحت التفريغ ثم تخزن فى زجاجات محكمة الغطاء عند درجة حرارة ٤° س.

★ تحضير مستخلصات اللحوم وتثبيت القياسات:

Preparation of meat extracts and stabilised standords

١- العينة تجهز لطريقة ELISA من عينات ممثلة للحوم عشوائية.

٢- يجنس خليط من لحـوم البقر والخنزير (٣ - ١٠٪) فى الماء أو محلول ملحى (٢٠ جرام لحم إلى ٨٠ ملل سائل Ca ٦٠ إس)، ثم يرشح.

٣- الراشح إمـا يستخدم مبـاشرة أو يجمد فى عـينات كل منهـا ٥ ملل أو يجفف بالتجميد حتى الاستخدام فيـما بعد كقياسات لِبُنية العينات كما هو مطلوب بتركيز ٦٠ - ٦٥ ملم/ ١٠ ملل من الماء.

٤- مستخلص حقيقـى وآخر يحضر من مادة مفرزة (exudate) من أنسجة اللحوم الطازجة المذابة من التجمـيد (نقط) بعد التخفيف (١ : ١) بماء مقطر ويرشح.

٥- يحضر ٢٠ ميكرولتر من المادة الثانية من على أقراص الورق الماص كما سبق ذكره.

كواشف اليسا ELISA reagents

١- محلول محايد من الكربونات والبيوكربونات (B) ذات أس هيدروجينى ٦,٤ لتحـصين مضادات الأجسـام أو محلول غـسيل من الفـوسفات الملحى.

٢- توين ٢٠، PBST ذات اس هيدروجـينى ٧,٢ وانزيم كمادة خـاضعة لفـعل خـميـرة ما (Substrate) لطـور التحـضين (محـلول سيـترات الفوسفات المحايد ذات أس هيدروجينى ٥) يحضر مع Analar grade chemicals.

٣- أنواع من الألبيومين النقـى من البيروكسيدير IgG Rabbit antigoats، وبيروكسيديز goot - antirabbit - IgG conjngates.

٤- ٣، ٣، ٥، ٥، ترامیثيل بنزين (TMB) انزيم substrate.

٦- مضادات الأمصـــال لمضادات الأنواع rabbit precipitating ضد البقر، ضد الخيل، ضد الخنزير، ضد الغنم/ الماعز.

★ تحضير المصل الطبيعي للحيوانات المختلفة:

يحضر أمصال البقر والخيل والخنازير والغنم من دم الحيوانات المذبوحة فى المسالخ المصرح لها بذبح الحيوانات فيها تحت مراقبة بيطرية جيدة.

★ أمصال مضادات الأجسام لمضادات أنواع الحيوانات المعالجة:

Anti-species antibody "blocking" treatment

١- تنقع أقراص الأجسام المضادة لـنوع الأغنام فى محلول PST المحتوى على البيومينات متـغيرة الخواص (١ ملم/ ملل ca) مثال: قرص مضاد للخنزير يضاف إلى ٢٠ ملم PBST (يعادل ١: ١٠٠٠ من محلول العمل) المذاب فى ٢٠ ملجم فى كل من البيومينات البقر، الغنم والخيل.

٢- ترج المحاليل بلطف أثناء التـحضين لمدة ١ - ٢ ساعة عند درجة حرارة ٢٠ - ٢٥° س (درجة حرارة الحجرة).

٣- حالات كتل مضادات الأمصال تعطى استجابـة مناسبة خاصة لكل نوع بينما تقل التداخلات التفاعلية إلى أقل ما يمكن (لـ٢٠٪ قيمة إمتصاص متماثلة) تثبت على لوح خشبى مصمم مثل رقعـة الشطرنج للمعايرة حيث تؤثر على العلاج المتغير وتخفيف مضادات الأجسام عند المقارنة.

٤- كل نوع من مضادات الأمصال يخفف بالترتيب من ١: ٥٠ إلى ١ : ٦٠٠ فى PBST ، وتخلـط بأحجام متـساوية لثلاث محالـيل من الألبيومـينات المختلـفة (تحتوى عـلى ٢ ملجم - ١ مـلجم - ١٠٠ ميـكروجرام أو ١٠ ميكروجرام/ ملم من كل نوع) فى نفس المحلول المخفف.

٥- يحضـن المحلول كمـا سبق قبـل الاستخدام فـى حفر منـاسبة من شـرائح

ELISA قبل تغطيتهـا بمختلف الألبيومينات، المصل العـادى أو مستخلصات اللحوم.

٦- مضادات أجسام الأرانب الـتجارية (ترتفع ضد بروتينـات مصل الدم) حيث تعالج كل واحدة منها فى محاليل مختـلفة من المصل العادى بنفس الطريقة مثل ١٦ ميكرولتر من مضادات الأمصال مضاد للخنزير (Anti-pig antiser-um) (غيـر مخفف مـثل المجهـز) وكانت الـببتيـدات فى محـلول PBST (١٣,٥ مـلل)، المصل العادى للبقر (٧٥, ٠ مـلل)، والمصل العادى للغنم (٧٥, ٠ ملل) والمصل العادى للخيل (٧٥, ٠ ملل).

٧- المقادير الضخمة تخفف مضادات الأجسام بالتسلـسل ضد مختلف التركيزات لمختلف العلاجات على شرائح اليسا (ELISA) قبل تغطيتها بمختلف أنواع الأمصـال المختلفـة أو المتشـابهة (١: ١٠٠٠ تخـفيف) أو مـستخلـصات اللحوم.

★ طريقة اليسا (ELISA)

١- طريقة اليسـا غير المـباشرة تؤدى إلى تقدير التأثير قبل المعالجـة بطريقة: اليسا لمختلف مضادات الأمصال لمختلف الأنواع غيـر النقية ولتحضير الاستخدام اللاحـق (المعالـج وغير المـعالج) كـما فـى اليســا أولا كواشف مـضادات الأجسام تستخدم للتفريق بين كل الأنواع المتشابهة.

٢- تتبع بخطوات أساسية من الطريقة الأساسية باستخدام ٩٦ حفرة من شرائح اليسـا وتحضـن فى درجة حرارة ٢٣° س (درجة حرارة الحجـرة) لمدة ساعة فى جـميـع المراحـل ما عدا المـادة الخاضـعة النـهائـية لـلانزيم (enzyme substrate) تحضن فى درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة قبل النتيجة.

٣- موازيا لهذه الطرق التى تجرى لكل محـلول مضاد للأجسام مضاد لكل نوع

تحت الاختبار (معالجة أو غير معالجة) مضادة لحساسية الحفر بأعداد أنواع الألبيومينات المخففة بالتسلسل (من ٢٥ ميكروجرام/ ملل)، المصل الطبيعى (من ١: ١٠٠٠) ومستخلصات اللحوم (من ١ - ١٠) مغطاة بمحلول محايد.

٤- فى هذا النظام «أولاً» يعين مضادات أجسام الأغنام بواسطة مضادات الماعز IgG بيروكسيديز المتحد، مستخدما نصائح المصنعين ومضادات أجسام الأرانب الأخرى التى تعين بواسطة مضاد الأرانب IgG بيروكسيدز المتج.

٥- المادة الخاضعة لفعل خمير ما (substrate) (TMB) ١٪ فى محلول substrate المحايد + ١٪ هيدروجين بيروكسيد) يترك التفاعل حتى يظهر بوضوح بالرؤية بظهور اللون الأزرق والناتج عن اللون الأصفر بعد معاملته بحمض الكبريتيك ١٢,٥٪ .

٦- تقرأ قوة اللون (intensity) بقياس الامتصاص عند طول موجة ٤٥٠ نانومتر فى شرائح Micro-ELISA قوة اللون تدل على التفاعل الإيجابى لمضاد النوع الأول مضاد المصل (أو ارتفاع التداخل التفاعلى) واللون الباهت يدل على ضعف الاستجابة (أو التداخل التفاعلى).

٧- جميع الشرائح تحتوى على ضوابط حيث تقاس استجابتها باستخدام هذا النظام فى حالة مصل الغنم الطبيعى أو مصل الأرانب الطبيعى، بدلا من (instead) مضاد الأنواع مضاد الأمصال تحت نفس ظروف الاختبار وتخفيف المعاملة المعالجة (treatment) نهاية كل فحص يجرى حفر كضابط were virtully colourless (١,٠ > امتصاص) عند ١: ١٠٠٠ تخفيف مع قليل من الاستثناء (Exception) بعض التجارب تحتوى على حفر blank لمضادات الأجسام (PBST بدلاً من الأجسام المضادة الأولى) وتحديد نسبة إمكانية التداخل التفاعلى بالارتباط بالمضاد IgG الثانى.

٨- على القاعدة اليومية ضرورة فحص الحفر المغطاة بالانتيجين الصافى، مصل أو مستخلص اللحوم، مع محلول مضادات الأجسام الإيجابية (AP) (مثل معالجة مضادات الأنواع لمضادات الأمصال فى PBST) ومضادات الأجسام السالبة التفاعل (AN) (PBST أو المصل المناسب مساوى للتخفيف المقابل لـAP). هـذا يـرجع إلـى اخـتـلاف خـلـفيـة لـون الانـزيم substrate، الاختلافات فـى الارتباط Non-Specific واحتمـال التداخل التفـاعلى أو cross-reaction للانتيجـين الثانى IgG لمستخـلصات اللحوم الممتـصة على الطور الصلب قيمة امتصاص سليمة.

النتائج والمناقشات:

١- طريقة إنتاج مـضادات الأمصال باستخدام الأغنام كحـامل تتخذ الإجراءات الوقائـية للحيـوانات عالية الـتأثير باستـخدام أنواع نقيـة من الألبيومـينات كأنتيـجينات تنتج فـى أنواع خاصة جيدة من الـبقر استجابة فـى اختبارات AGID عن الـسابقـة التى لـوحظت باسـتخدام الأرانـب لإنتاج مـضادات أمصال الألـبيومين الـبقرية. ومـضادات أمصال الخـنازير والخيـل وجدت متـساويـة فى الخواص والحساسيـة (قادرة على تعيـين أقل من ٥٪ من نوع واحد من اللحوم عـنها فى الآخر مثل الخنزير فى البـقر أو العكس) بدون أى أولويات للمعالجة.

٢- جميع الثـلاث مضادات الأمصال غير المعاملـة تعطى استجابة ملائـمة عالية غير مـباشرة بطـريقة ELISA (قيـمة امتـصاص > ١) لمضادة أنـتيجيـنات الألبيومين المتجانسـة (HR) مدروسة حتى ١٠٠٪ لكل تخفيف والتفاعلات المتقاطعة Cross-reactivity (CR) نسبة HR عند نفس التخـفيف يميل إلى التقليل أكثر عند نفس المستوى مثلاً CR يخفف إلى HR حيث يبقى ثابت الارتفاع وذلك لزيادة أنواع خاصة لمضادات الأجسام الموجودة.

٣- فى بعض الحالات مثل مضادات BSA ضد ESA، مضاد ESA ضد BSA، التخفيف المؤثر وحده حرف لتخفيض CR إلى < ٢٠٪ (هذا لعينات اللحوم وليس لتحليل اللحوم المخلوطة، whilst in otherss مثل مضاد PSA ضد BSA ، ESA، CR ما زال مرتفعًا حتى ٣٠٪ عند العوامل العالية التخفيف.

٤- الاستجابات المتعادلة ضد البيومين الغنم النقى وجدت (منخفضة < ١٥٪) ما عدا عند معظم التركيزات المخففة لمضاد BSA (١: ١٠٠ - ٨٠٠) المتوقعة فى الحيوانات الوسيطة مثل الغنم حتى ١ : ١٠٠٠ يعطى المحلول العملى المخفف.

٥- اختبار مستخلصات اللحوم المركبة تتطلب تخفيض CR فى العلاقة المتماثلة مع التركيزات.

٦- معظم التأثيرات المتداخللة للمعاملة المعالجة من الأمصال المختارة اختيرت على قاعدة استجابة ELISA للشريحة المحتوية على انتيجن نقى.

٧- كل مضاد للأمصال تتطلب معالجة بالبيومينات مختلفة الخواص عند تركيزات حتى ٥٠٠ ميكروجرام/ ملل فعليًا لتخفيض CR فى تخفيف ١: ١٠٠ - ٤٠٠ أعلى من ١: ٨٠٠، CR ٢٠٪ أو أقل بهذه المعالجة يظهر فى شكل ١ من اليمين.

٨- التخفيف الموصى به هو ١: ١٠٠٠، قبل الاندماج فى المعالجة بحوالى ١ - ٢ ساعة بواسطة الألبيومينات مختلفة الخواص عند تركيز ١ ملجم/ ملل، CR مغلق كاملاً فى التجربة ضد الانتيجين النقى.

٩- لا يلزم إزالة زيادة الألبيومينات مختلفة الخواص أو منتجات CR من المخلوط المحضن لأن كل المخلوط فى PBST مخفف ذو مضادات

الأجسام الحرة لأنواع معينة فقط الوحيدة المحتوية على تفاعل داخلى فى الطور الصلب وغير محدد الارتباط تمنع بحقن توين ٢٠ كمادة منظفة.

١٠- عمومًا التحضين ١ - ٢ ساعة عند درجة حرارة الحجرة متطلبة قبل الاستخدام الابتدائى بينما محاليل الأجسام المضادة المعالجة تتأثر بعد تخزينها طول الليل عند درجة حرارة ٤° س وتستخدم الآن بثقة لمدة ٣ أيام بعد التحضير.

١١- مضاد BSA، ESA، PSA مضاد للأمصال، المعالجة وغير المعالجة تقارن بمضادات الشرائح المحتوية على مستخلصات لحوم outhentic specees (البقر - الخيل - الخنزير والرومى والغنم) توضع فى قرص منقوع فى جسم من CB لمدة ساعة عند درجة حرارة الحجرة.

١٢- CR الملاحظ (شكل ٢) مستخدما مضاد الأمصال غير المعالج مشابه للنتيجة المحتوية على الانتيجين النقى، بينما مضاد الأمصال غير المعالج فى نفس الاختبار مشابه للنتيجة المحتوية على ضد الانتيجين النقى والمحضر كمضاد للمصل فى نفس الاختبار وينتج استجابة غير ثابتة بين الخواص المتماثلة والمختلفة الخواص.

١٣- هذا الاختبار ناجح فى تعيين ثلاث أنواع من اللحوم (بقر، خيل، خنزير).

١٤- جدول ١ يلخص الاستجابة غير المباشرة فى ELISA المتحصل عليها من مختارات من عينات لحوم الخنزير باستخدام مضاد مصل البيومين الخنزير عند التركيز الأقصى.

١٥- قيمة الامتصاص الصحيحة لعينة مسحونة (مستخلصة بالماء أو بالمحلول الملحى) تصل حتى ٠,٩ - ١ ولا توجد علاقة تنافسية لمختلف محتويات الألبيومينات والمقاسة بواسطة طريقة ELISA المطورة.

١٦- المستخلص المائى يعطى قيمة عالية بسيطة (متوسطة ٠٦, ١، s.d. ٠٣, ٠) عند المحلول اللملحى (متوسط ٠٩٧, ٠، s.d. ٠٦, ٠) وهذا اللون يتكون فى عينات اللحوم النقية من أى نوع تحت الاختبار وأعلى من ٥٠٪ فى معظم المخاليط البديلة، بينما ارتباط بقايا الألبيومين بالارتباط المناعى بين أصناف البروتينات الذائبة فى الماء.

١٧- الاستثناء الوحيد باستخدام سوائل المفرزة من الأنسجة الطازجة لعينة واحدة (تمتص من على الأقراص الضابطة والمطبقة مباشرة على الامتصاص المناعى بحجم مناسب من CB ، تعادل أقراص الخنزير الثابتة يعطى استجابة متماثلة منخفضة عند مقارنتها براشح مستخلصات اللحوم فى نفس التجربة assay. هذا قد يرجع إلى تداخل جزيئات الدهون Lipid أثناء خطوات التغطية الأولية أو تخفيض الأنتيجين، بينما التطبيق البسيط لعصارة اللحوم من خلال الاستخلاص بالماء عادة ينصح للمخاليط عندما يستخدم الاختبار غير المباشر ELISA على قاعدة وجود بقايا مصل البروتينات.

١٨- جدول ٢ يبين خطوط مستخلصات العينات والمراجع المستخدمة فى التجارب المستخدمة المختبرة وحساسية الطريقة (لحوم الدجاج المحتوى على لحوم الرومى والخنزير والبتلو فى المنتجات الخام).

١٩- كما هو سابقًا قيمة الامتصاص المتماثلة من لحوم الخنزير النقية، البقر، الخيل هى ≤ ٩, ٠ وحدة أعلى من الاستجابة المتنافرة حيث أنه واضح من النتائج ظهور الألوان الأصفر الفاقع فى تباين الألوان الباهتة أو عديمة اللون تعطى نتائج غير مرغوب فيها، ما عدا الرومى المضاد للخنزير. هذا يمكن أن يخفض الاستجابة البسيطة فى التجربة لمعالجة مناسبة لتعضيد الحساسية.

٢٠- المستخلصات السائلة المختلطة تحتوى ما بين ٥، ٥٠ ٪ من نوع واحد فى الآخر (مثال لحوم خنزير، بقر) تغطى نفس الزيادة فى حساسية الامتصاص لتعيين الأنواع الملوثة كما هو موجود أصلاً من مستخلصات لحوم الخيل فى لحوم البقر مستخدمًا مضادات المصل النقية.

٢١- تعيين لحوم الخنزير فى مختلف المخاليط من اللحوم البقرية المفرومة ممكن فى حدود ٣ ٪ تقريبًا مثبتة على قاعدة زيادة فى قيمة الامتصاص للعينة ضد اللحوم البقرية النقية.

٢٢- إضافة ٣ ٪ من لحوم الخنزير فى لحوم بقرية تعطى قيمة امتصاص ٥٣, ٠ بينما المختبرة ضد PSA بالمقارنة إلى اللحوم البقرية (٠٧, ٠، ١٩, ٠، ٠٣, ٠، ١٦, ٠)، الغنم (١٦, ٠) والخيل (١٣, ٠-١٧, ٠) والرومى (٣٦, ٠) يمكن تعيينها ومن ناحية أخرى يسبب استجابة لحوم الرومى بمضاد PSA أعلى بسيط عن قيمة الاستجابة المتنافرة الأخرى. التجربة assay لا يمكن أن توضح الاختلاف بوضوح عند ٥, ٢ ٪ من لحوم الخنزير فى اللحوم البقرية (هذا يتطلب تخطى cross - reactivity إذا تطلبت الضرورة المشتركة معاملة لحوم الرومى لتعضيد مضاد المصل الخاص أو يعزز اختفاء لحوم الدجاج.

٢٣- التفاعل الرجعى المنخفض المتماثل (Correspondingly low cross - reac-tivity) نتيجة من مضاد لاختبارات ESA ويتضح أن الاستجابة لا تختلف كثيراً فى هذه المخاليط

٢٤- يتضح من الناحية العملية أن الفصل المرتفع لقيمة الامتصاص تتطلب تمييز لحوم الخنزير بدون تردد فى اللحوم البقرية إما ٣, ٠ وحدة أعلى للـCR عن القياسات للأنواع الأخرى أو قيمة > ٤٠ ٪ من الاستجابة المتماثلة.

٢٥- هذه الطريقة غير كافيــة الحساسية لتعيين ٣٪ من لحوم الخنزيـر فى المقانق (الـسجـق) المصنع مــن اللحوم البـقرية ويمكــن تحليلهــا بمضاعفــة مضادات الأجسام بطريقة الساندوتش من ELISA.

٢٦- نفس أساس مــا قبل اليسا تحـضين مضادات الأجسام تـنجح فى التطـبيق على بعــض مضادات الأمصال التـجارية (مضاد للـخنزير ومضاد لـلخيل) التفاعل الرجعى المرتفع يظهر بوضوح حينما تستخدم مضادات الأجسام غير المعالجة.

٢٧- ما قبــل المعالجة ينصــح لكل مصل مــضاد يشابه حــالة المرحلة فى الـيسا المغلقة (blocking) وذلك للتميــيز أو التفريق لانتيجينات الـفيروس المسبب لمرض اللسان الأزرق blue tongue بينما فى هذه الطريقة يثبط منع التفاعل الرجعى غيــر المرغوب فيه rabbit anti - mous IgG enzyme conjngate (بإضافة ٢٪ حجم مــن المصل العادى الـنهائى، بـقر أو غنم إلى مــخفف مرتبط مباشرة قبل الاســتعمال)، التجربة assay أعطت تأكيد تـثبيط كامل لجمع التفاعل الرجعى لكل الأنــواع من مضادات الأجسام مباشرة ضد كل بروتينات مصــل الدم بما فى ذلك IgG، والمتطلب مزيد مــن الصرامة قبل العلاج للترسيــب المناعى لمضادات الأمصال. وبينما وأحيــانًا منتجات مضاد - البقر، مضــاد - الغنم/ الماعز تعطى اســتجابة عالية ضد أمــصال البقر، الغنم وتثبط التفاعل الرجعى بالمـعالجات المشروحة سابقًا. وأيضًا تبدأ تثبيط الاستجابة المتماثلــة. هذا يدل على وجود نفس epitopes لهما على الطور الصلب والانتيجينات المعالجة وقد يشرح لماذا بعض الباحثين يجدوا التفاعل الرجعى غير المتوقع باستخدام نفــس مضاد - الغنم/ الماعز مضاد مصل فى اختبار الانتشار المناعى.

٢٨- يتضح أن مضادات الأمصال لتعيين اللحــوم البقرية الخاصة زيادتها بالقرب

من التى لها علاقة بالحيوان الوسيط مثل (الغنم/ الماعز) للحصول على أقصى نتائج ثابتة بطريقة ELISA بين لحوم البقر والغنم (أو لحوم الماعز) أحسن دليل على اختبار AGID.

٢٩- وعلى النقيض طريقة نقاوة طريقة الفصل ترجع إلى مضادات الأجسام الخاصة بأنواع الامتصاص المناعى للأعمدة اللاحقة المطبقة فى طريقة ELISA هذا التطوير لقاعدة طريقة ELISA يقفل التفاعل الرجعى خلال تفاعل الخليط تاركا مضادات الأجسام للأنواع الخاصة حرة لتدخل فى التفاعل مع موقع الانتيجينات الخاصة عند الطور الصلب.

٣٠- كروماتوجراف الامتصاص المناعى يستهلك الوقت، غالى عند إنجاز معالجة التفاصيل الفنية.

٣١- يفضل استخدام مضادات الأجسام جافة على أقراص حفظ وتوضع مضادات الأمصال السائلة تحت المجمد لحين استخدامها.

٣٢- يراعى عدم حفظ مستخلص اللحوم على أقراص لمدة طويلة لتحللها.

٣٣- هذه الطريقة مبسطة وتحتوى على معالجة مضادات الأحسام وثبات القياسات على الأقراص الجافة.

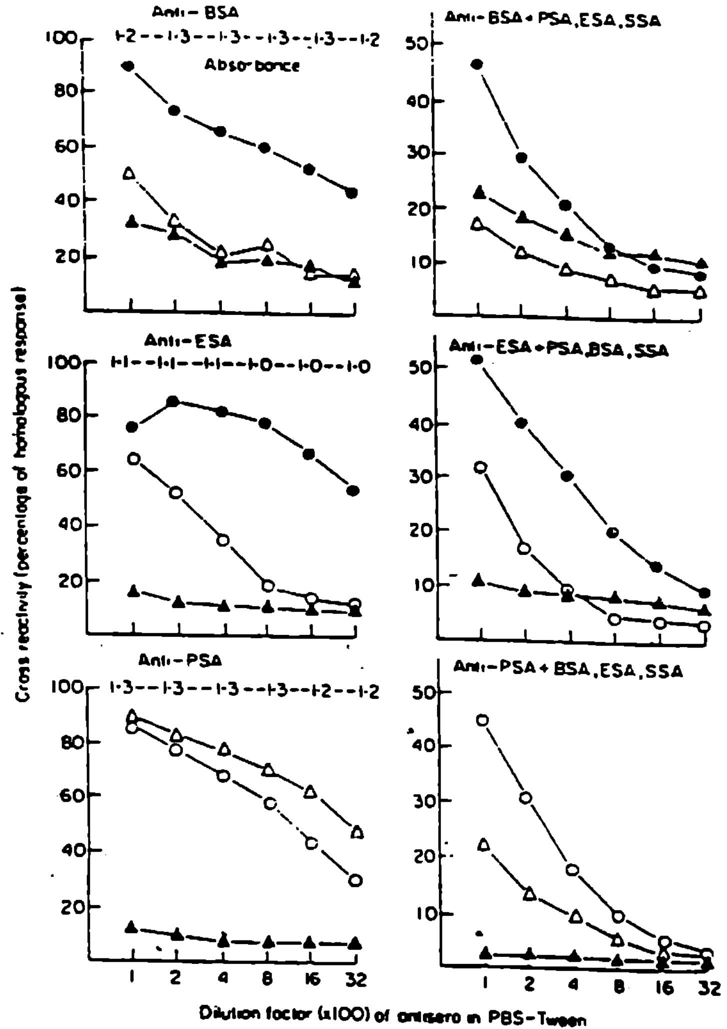


Figure 1. Optimisation of antibody dilution and blocking treatment to minimise the heterologous cross-reactivity of anti-species antisera in indirect ELISA. Untreated antisera (left) raised against bovine (BSA, ○), equine (ESA, △) and porcine serum albumin (PSA, ●) in sheep were tested in triplicate wells on ELISA plates coated with pure species albumins, including sheep (SSA, ▲) over a dilution range 1:100-3200. Homologous absorbance values (means) shown for the untreated antisera were similar after treatment (right) and are represented as a maximum. Cross-reactivity is expressed as percentage of the homologous response. Treated antisera (right) comprised PBST solutions of anti-species antibody over the same dilution range plus 500 $\mu g\ ml^{-1}$ of each heterologous albumin, as shown.

شكل (١)

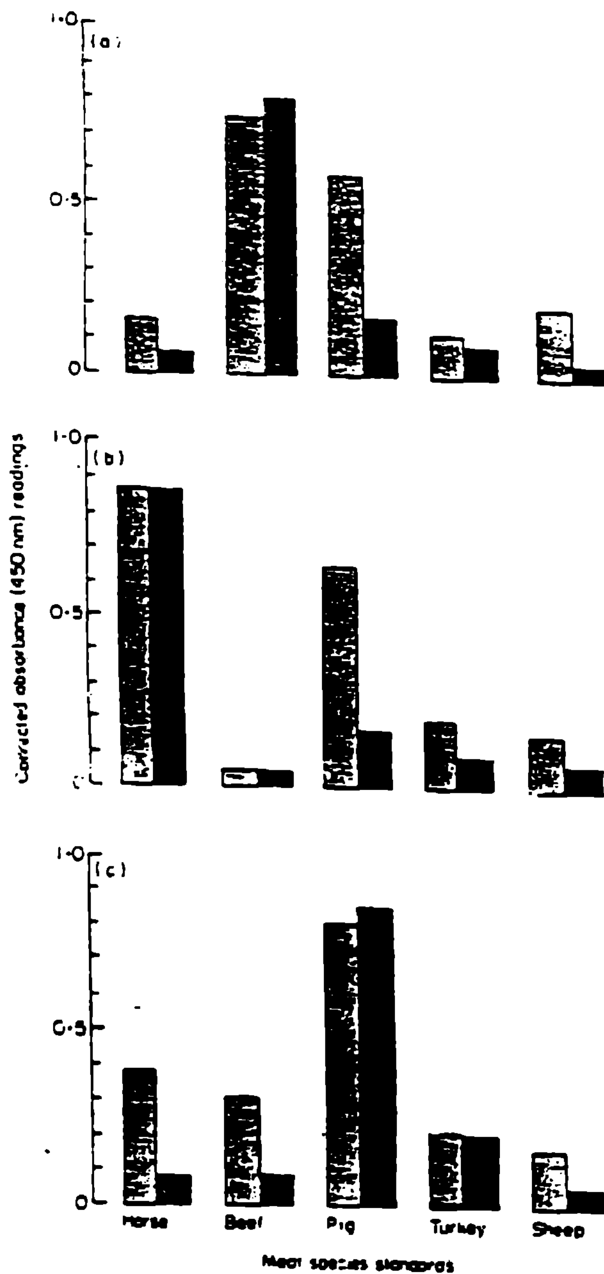


Figure 2. Species-specificity of sheep anti-species albumin antisera (pretreated as in section 2.b) in the differentiation of beef, pig and horse meats (applied to the plate as a disc): (a) anti-cow, (b) anti-horse, (c) anti-pig. (□), untreated; (■), treated with heterologous albumins.

شكل (٢)

Table 1. Indirect ELISA response (absorbance) to pig meat samples using pretreated sheep anti-pig albumin serum

Species eat samples	Albumin content (mg g^{-1} of sample)	Extraction method: Saline (shaken well)	Water (homogenised)	Drip (in sample bag)
:				
g (v)[a]	0.32[b]	0.95[c]	1.07	—
g (*m. biceps* *femoris*)	0.30	0.98	1.01	—
m (v)	—	0.95	1.06	0.88
lly (v)	1.03	0.88	1.03	—
houlder (v)	0.63	1.06	1.08	—
eek (v)	1.43	1.00	1.10	—
an (±s.d.)		0.97 (0.06)	1.06 (0.03)	
ef extract (v)			0.05	
ef disc[d]			0.04	
rse extract (v)			0.03	
rse disc[d]			0.05	
g disc[d]			0.78	

[a]Meat samples (removed from different carcasses at random) were trimmed of excessive fat and connective tissue and mminuted (Moulinette-S chopper).

v, Various muscles included in the sample were not defined.

[b]Albumin content of the comminuted samples was estimated by a competitive ELISA[2] against standard pig albumin (PSA) lutions (1 μg ml^{-1}–2 mg ml^{-1}).

[c]Absorbance: 450 nm values (corrected for background/antibody-blank response) are averaged duplicate readings.

[d]Section 2.3.

جدول (١)

Table 2. Indirect ELISA responses (absorbance) of pretreated sheep anti-pig, -beef and -horse sera. Results of one assay to test sensitivity with meat mixtures

Species[a]	Antiserum		
	Anti-Pig (PSA)	Anti-Beef (BSA)	Anti-Horse (ESA)
Beef (D)	0.07[b]	1.09	0.08
Sheep (D)	0.16	0.10	0.16
Turkey (D)	0.36[d]	0.15[d]	0.26[d]
Pig (D)	1.27	0.19	0.29
Horse (D)	0.13	0.12	1.35
Beef 1 (S)	0.19	1.18	0.17
Beef 2 (S)	0.03	1.08	0.01
Pig (S)	1.28	0.20	0.17
Horse (S)	0.17	0.17	1.17
Mixed liquid extracts			
0 Pig 100 Beef (1, above)	0.16	1.13	0.14
5 Pig 95 Beef	0.66	1.07	0.14
10 Pig 90 Beef	0.81	1.06	0.11
20 Pig 80 Beef	0.98	1.07	0.08
50 Pig 50 Beef	1.11	1.02	0.17
70 Pig 30 Beef	1.17	0.93	0.14
90 Pig 10 Beef	1.16	0.53	0.16
100 Pig 0 Beef	1.22	0.13	0.15
Pig/Beef mixtures[c]			
2.5% Pig (M)	0.35	1.13	0.07
3.0% Pig (M)	0.53	1.15	0.10
5.0% Pig (M)	0.72	1.17	0.12
10.0% Pig (M)	0.89	1.21	0.11
10.0% Pig (M)	0.84	1.13	0.17
Beef sausage (3% Pig)	0.29	0.70	0.14

D. Meat standard discs (section 2.3).

S. Mixed minced muscle samples, fat content <10%.

[a] S. Meat samples; D. meat standards.

[b] Absorbance 450 nm values as Table 1.

[c] Pig meat detection in minced beef (M) and beef sausage from different sources, prepared at the Institute.

[d] Blocking treatment of antisera in this assay did not include turkey serum albumin. The possibility of cross-reactivity with poultry meat should be noted.

جدول (٢)

المراجع:

1- Clifford. M. N. *Immunoassays in Food Analysis* (Morris. B. A.: Clifford. M. N., Eds.) Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London. 1985. 3-8.

2- Kang ethe. E. K.: Jones. S. J.: Patterson, R. L. S. Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Sci.* 1982, 7, 229-240.

3- Whittaker, R. G.: Spencet. T. L.: Copland, J. W. An enzyme-linked immunosorbent assay for species identification of raw meat. *J. Sci. Food Agric.* 1984, 34, 1143-1148.

4- Griffiths, N. M.: Billington, M. J. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for beef blood scruni to determine indircctly the apparent beel content of beef joinsts and model mixtures . *J. Sci. Food Agric.* 1984, 35, 909-914.

5- Pattcrsor., R. M.: Whittakcr, R. G.: Spencct, T. L. Improved species identification of raw meat by double sandwich cnzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agric.* 1984, 35, 1018-1023.

6- Jones, S. J: Patcrson, R. L. S. Double-antiboldy ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.* 1985. 15, 1-113

7- Jones, S. J: Patterson, R. L. S. Simplified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative meat species idcntification. In: *Biochemical Identification of Meal Species* (Patterson, R. L. S., Ed.) Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1985, pp. 107-117.

8- Dobersstein, K-H.: Greucl, D. The preparation of specific antisera for the identificaltion of meat of African Antilope species in the agar gel precipitation test. *Fleischwirtsch.* 1982, 62, 1011-10113.

9- Hayden. A. R. Immunochemical detection of ovinc, porcine and equine flesh in beef products with antisera to species myoglobin. *J. Food Sci.* 1979, 44, 498-499.

10- Mageau, R. P.: Cutrufclli. M. E.: Schwab, B. Johnston. R. W. Development of an overnight rapid bovine identification test (ORBIT) for fietd usc. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67, 949-954.

11- Hudson, L.: Hay, F. C. *Practical Immunology* (2nd edn). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980, 238.

12- Anderson. J Use of monoclonal antibody in a blocking ELISSA to detect group spectific antibodies to blue-tongue virus. *J. Immunol Meth* . 1984, 73-74, 139-149.

13- Gleeson. L. J. Waket. P. R. Specificits controls on commercial serologic teagentss for meal speciation by agat gel diffusion tests *Aust Vet J* 1984, 61, 165-166.

طريقة الانتشار المناعى فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات

Immunodiffusion Technique for the Identification of Animal species.

Guy Fugate et: al J. of the AOAC, Vol. 54, No. 5, 1971

طريقة الانتشار المناعى فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات

أساس الطريقة:

طريقة الانتشار المناعى فى الأجارجيل تستخدم فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات. نموذج من الحفر وأوعية مقطعة من شرائح الأجار. الحفر والأوعية تحتوى على الانتجين ومضادات المصل على التوالى. انتشار الانتجين ومضادات المصل خلال الأجار نتيجة تكوين خط الترسيب (precipitin line). حينما يكون الانتيجين - الأجسام المضادة فى أعلى حالتها، يعتمد التفاعل على وضع تكوين خطوط الترسيب فى علاقة كل منهما للآخر. إحدى عشر عينة من اثنى عشر عينة لحوم مخلوطة ثم التعرف عليها بالضبط بطريقة الانتشار المناعى فى الأجار جيل. هذا الاختبار سريع وبسيط لتأكيد وتعزيز النتائج. طريقة الترسيب الحلقى فى الأنبوبة للتعرف على لحوم أنواع الحيوانات المختلفة.

الطريقة:

- تحضير العينة **sample preparation**

١- تحضير لحوم مفرومة من حيوانات معروفة وحيوانات غير معروفة معلومة الوزن.

٢- يحضر المستخلص بإضافة محلول ملحى (٠,٨٥ ٪ صوديوم كلوريد) لمدة ١,٢ - ٢ ساعة بنسبة ٣ : ١ (w/v).

٣- يرشح المستخلص مباشرة بورق ترشيح نمرة ٤٢ قبل عملية التحليل.

٤- المستخلص يخزن تحت المجمد أو فى المجمد وهذا يتطلب إعادة الترشيح قبل الاستخدام.

- **تحضير الأجارجيل Agar-gel preparation**

١- يحضر ١٪ أجارجيل (ion agar No2).

٢- يسخن الخليط لدرجة الغليان.

٣- يرشح الخليط من خلال صوف زجاجى أو من خلال ٤ طبقات قماش (cheese cloth)

٤- يؤخذ ١٠٠ ملل من الراشح ويوضع فى وعاء ذات غطاء (screw-cap).

٥- يعقم فى الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة عند ضغط ١٥ رطل.

٦- يبرد الأجار إلى درجة حرارة ٤٩ - ٥١° س.

٧- يضاف مرثيولات merthiolate إلى التركيز النهائى ١ : ٥٠٠٠.

٨- يوضع فى Tighten caps ويحفظ عند درجة حرارة الغرفة حتى الاستخدام.

- **تحضير الأطباق plate preparation**

١- يسيح الأجار مرة أخرى فى حمام مائى عند درجة الغليان.

٢- يوضع ٢٠ ملل فى أطباق بتردش بلاستيكية (٢٥ مم × ١٠٠).

٣- يبرد الأجار الصلب فى الثلاجة لمدة ٣٠ - ٦٠ دقيقة حتى يصل إلى أقصى ثبات.

٤- يقطع الأجار على هيئة حفر (شكل ١) ويزال الأجار الزائد بواسطة قطعة من القطن.

٥- تغطى حفر الأجار والوعاء بأجار منصهر.

٦- تحفظ الأطباق فى المبرد (الثلاجة) حتى أسبوعين فى حالة عدم وجود مجفف أو ظهور مواد نامية عليه.

- **الشحن والتحضين Charging and incubation**

١- توضع علامات على الأطباق المختارة للتعرف على العينة للتأكد من سلامة تفسير النتائج.

٢- يستخدم طبق لاختبار نوعين من الأنسجة معروفين مع العينة المجهولة.

٣- يضاف المستخلص المرشح (الانتيجين) إلى الحفر والأحواض المحتوية على مضادات الأجسام (antisera).

٤- يستخدم مضادات الأجسام التى تتفاعل مع الانتيجينات المتماثلة (انتيجينات نسيجية معروفة) شكل ٢.

٥- يعاد شحن الأطباق بالانتيجينات بعد ساعتين.

٦- تحضين الأطباق لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة فى صندوق عالى الرطوبة (humidity) فى درجة حرارة الحجرة.

٧- بعد التحضين تفحص الأطباق والتعرف على خطوط الترسيب بوضعها على سطح أسود مع تسليط ضوء مباشر من الجانب.

٨- خطوط الترسيب تظهر بلون رمادى على الأجار الصافى.

٩- إذا لم تظهر خطوط الترسيب يعاد تحضينها لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة ثم يعاد فحص الأطباق.

١٠- تغسل الأطباق بلطف بالماء لإزالة الفيلم من على سطح الأجار والبروتينات المترسبة فى الحفر والأحواض.

١١- منظر الأطباق واسكتش خطوط الترسيب توجد على worksheat.

• صباغة وحفظ كتل الأجار جيل

staining and preserving agargd bloks

١- ديلزة (dialyze) أطباق الآجار فى محلول ملحى محايد من الفوسفات عند أس هيدروجينى ٧,٢.

٢- تغير الديلزة مرتين يوميًا لمدة ٣ أيام ومرة واحدة يوميًا لمدة يومين.

٣- يضاف ديلزة أخرى لمدة ٢٤-٢٨ ساعة فى ماء مقطر حمض (١ , ٠ ٪ حامض الخليك) لإزالة زيادة الأملاح.

٤- تغسل الأطباق برفق شديد بالماء المقطر.

٥- توضع الأطباق غطاؤها مفتوح جزئيًا فى المبرد (الثلاجة) لمدة ٢٤ - ٣٦ ساعة ليسمح بخروج الماء من الأجار.

٦- يقطع الأجار إلى كتل وترفع تبعًا للمنطقة الخارجية (شكل ٣).

٧- ترتب الكتل ومن ضمنها الحفر وخطوط الترسيب.

٨- توضع كل كتلة على شريحة زجاجية للميكروسكوب ويوضع عليها علامة واضحة ويفحص للتأكد من وصف الأطباق الأصلية.

٩- تغطى الكتل بورق وات مان نمرة ١ لتفادى وجود فقاقيع الهواء بين الورق والآجار.

١٠- يستخدم أدوات حادة لقطع وإزالة الورقة المغطى بها الحفر فقط.

١١- تجفف الكتل حتى تصبح فيلم رقيق.

١٢- تبلل الورقة بالماء المقطر وتزال.

١٣- يغسل الفيلم بلطف بماء مقطر بواسطة قطن applicator لإزالة شعيرات الورق العالقة.

١٤- يستمر فى تجفيف الآجار حتى يصبح فيلم رقيق جداً.

١٥- تصبغ الشرائح لمدة ١٥ - ٣٠ دقيقة بواسطة ponceau-R ثم يزال الزيادة من الصبغة بماء مقطر.

١٦- يزال لون الآجار (Decolorize) بتغيير الحامض الكحولى (١٪ حامض الخليك فى ٧٠٪ إيثانول).

١٧- تجفف الشرائح بواسطة محلول أكسلات الأمونيوم ذات البلورات القرموزية.

١٨- يخفف ١: ١٠٠٠ ca بحلول حامض كحولى.

١٩- يزال لون الأجار (Decolorize) حتى الكثافة المرغوب فيها بواسطة الحامض الكحولى.

٢٠- اللون الأزرق يضمحل قليلاً بعد التجفيف.

٢١- هواء جاف يمرر على الشرائح تحت غطاء زجاجى رائق وشفاف من mounting solution.

٢٢- الأجار فيلم يكون أزرق براق مع خطوط ترسيب حمراء وإذا كانت الرغبة فى التصوير يستخدم فيلم أرثوكروماتيك orthochromotic تظهر خطوط الترسيب غامقة على خلفية بيضاء.

- **تفسير تفاعلات الترسيب Interpretation of precipitin reaction**

تفسير التائج تعتمد على تكوين الخطوط بالانتيجين المعروف وغير المعروف (شكل ٤).

١- توضيح خط التطابق مثلاً خط الترسيب يتكون عندما تكون الانتيجينات متماثلة (شكل ٤).

٢- رؤية جزئية لخطوط التماثل، مثلا الخطوط التى تكونت حينما تكون المستخلصات متشابهة ولكنها تختلف فى تماثل البروتينات التى تتفاعل مع نفس مضادات المصل (antiserum).

٣- شكل (٥) يوضح التفاعل النموذجى مع الانتيجين غير المعروف واثنين من الانتيجينات المعروفة، يرى تماثل الخطوط الكاملة والجزئية.

٤- الانتيجين المجهول u يستمر فى تكوين رسم الموجة مع الانتيجين المعروف a لتماثل تكوين الخطوط.

٥- الخطوط المتكونة بالانتيجين المعروف b تظهر كمنبه لتكوينها بالانتيجين a، u والخطوط المتشابهة والجزئية التماثل.

٦- شكل (٥) أيضًا يوضح رسم تكوين خطوط الترسيب عندما تحتوى العينة أنسجة الانتيجينات من نوعين (حفر ba).

٧- مضادات الأمصال فى معظم الحالات لا تتفاعل مع الانتيجينات المتنافرة وخطوط جزئية التماثل لا تتكون. هذه توجد عندما تكون أنواع الحيوانات (مثل البقر والغنم) ذات القرابة.

٨- شكل (٣) يوضع المنطقة المحتوية على الانتيجين المتماثل بين نقطتين أو أكثر.

٩- أربعة من ٦ مناطق لها تفاعلات للانتيجينات مع مضادات الأمصال A (antiserum)، اثنين من ٤ مناطق توجد فى وضع التفاعل مع مضادات الأمصال B. والمنطقتين الباقيتين (٢، ٤) كضابط للحفر.

١٠- مخاليط الانتيجينات a ، b فى الحفر علامة ba تكون فى وضع التفاعل لنوعين من مضادات الأمصال وخطوط الترسيب الموضحة التى توجد حينما تحتوى العينة على أنسجة من نوعين.

التجربة Experimental

١- اثنى عشر عينة من اللحوم المفرومة من مختلف الأنسجة. كل عينة تزن نصف رطل جدول (١) يبين النسبة المئوية لتركيبات عينات اللحوم المفرومة.

٢- العينات الخاضعة لاختبار الترسيب الحلقى فى الأنبوبة والنتائج تؤكد بواسطة اختبار الانتشار المناعى.

٣- نتائج اختبار الترسيب الحلقى تعين باختيار مضادات الأمصال والانتيجينات المستخدمة فى اختبار الانتشار المناعى.

٤- مضادات الأمصال المنتجة من الأرانب بطريقة بروم (prooms).

٥- مضادات الأمصال المجموعة من دم أرانب merthiolated عند ١ : ٥٠٠٠٠، يرشح من خلال غشاء ترشيح مساميته ٠,٤٥ فى زجاجات معقمة مفرغة سعة ٣٠ ملل. وتخزن تحت المجمد فى الثلاجة حتى الاستعمال.

٦- كذلك مضادات الأمصال المستخدمة لأنبوبتين اختبار الترسيب الحلقى واختبار الانتشار المناعى.

٧- سرعة التفاعل وتخفيف مضادات الأمصال ١ : ٤ للاختبار الحلقى ويخفف ١ : ٢ أو ١ : ٣ لاختبار الأجارجيل.

٨- تجهز الشرائح (٢/ عينة) ويضاف الانتيجينات ومضادات الأمصال المناسبة إلى الحفر والأحواض.

٩- بعد ٢٤ ساعة من التحضين فى درجة حرارة الحجرة ويلاحظ خطوط الترسيب فى الشرائح شكل (٢).

١٠- جميع العينات ما عدا واحدة تم التعرف عليهم بالضبط عينة 1018 تحتوى فقط على أنسجة غنم وفسرت من مخلوط أنسجة بقرية وغنم.

١١- جدول (٢) يبين نتائج كل عينة مختبرة.

★ الخلاصات والتوصيات:

١- عينة من اثنى عشر عينة تخضع لعدم التعرف عليها بالضبط وذلك يعتقد أن اختبار الانتشار المناعى مؤثر للتعـرف على مخاليط اللحوم الحيوانية وتعضد مباشرة باختبار الترسيب الحلقى.

٢- هذه الطريقة بسيطة وسريعة ويوصى باستخدامها.

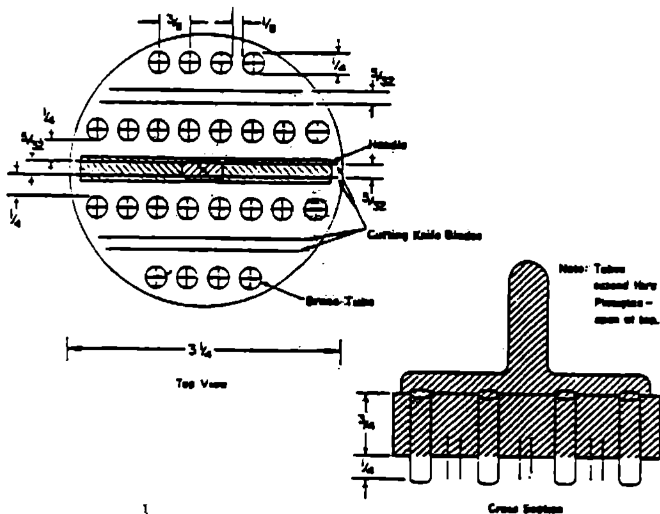


FIG. 1—Cutting tool used to cut pattern of wells and troughs in agar-gel.

شكل (١)

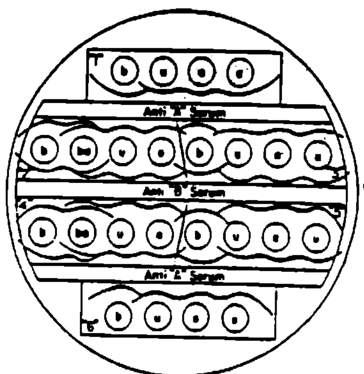


FIG. 3—Position and reaction sites (6 areas) each containing of 4 antigen wells.

شكل (٣)

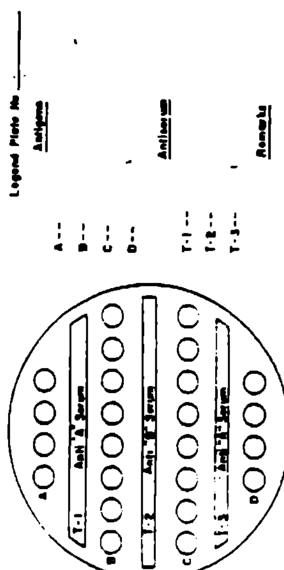


FIG. 2—Worksheet showing well and trough arrangement and antigen-antisera placement.

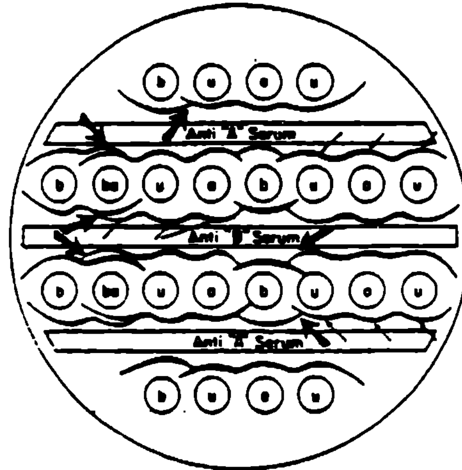


FIG. 3—Precipitin pattern resulting from heterologous antigen-antisera reactions: a, antigens derived from species A; b, antigens derived from species B; u, antigens derived from unknowns; ⇨, lines of partial identity; →, lines of identity.

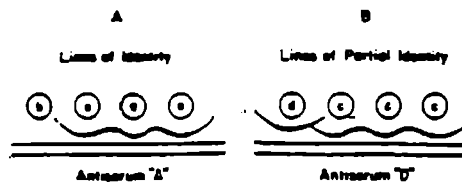


FIG. 4—Precipitin lines of identity and partial identity.

المراجع:

(1) Ouchterlony, O., *Handbook of Immunodiffusion and Immunoeleclrophoresis*, Ann Arobor, Mich., 1968.

(2) *Manual of Microbiological Methods,* Society of American Bacteologist Committee on Bacteriological Technie, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1957, p. 13.

(3) Proom, H., *J. Pathol. Bacleriol.* 55, 419-426 (1943).

أوفيدين (بيتا - الانيل - ل - ٣ مثيل هيستيدين 'بالانين')
والهيستيدين ثنائي الببتيد فى لحوم الخنزير

Ophidine (B-Alanyl-L-3- methylhistidine, 'Balenine' and other Histidine Dipeptides in Pig Muscles and Tinned Hams.

Patric R. Carnegie etal J. Sci. Food Agric, 1982, 33, 795-801.

أوفيدين (بيتا - الانيل - ل - ٣ مثيل هيستيدين 'بالانين') والهيستيدين ثنائى الببتيد فى لحوم الخنزير

تقديم:

الهيستيدين يحتوى على ثنائيات الببتيدات، كارنوسين (بيتا - ألانيل - ل - هيستيدين) وأنسرين (بيتا - الانيل - ل - ١ - مثيل هيستيدين) وأنسرين (بيتا - الانيل - ل - ١ - مثيل هيستيدين) معروف منذ زمن بعيد بوجوده فى أنسجة اللحوم. والهيستيدين الثلاثى يحتوى على ثنائى الببتيد، بيتا الانيل - ل - ٣ - مثيل هيستيدين موجود أيضًا فى لحوم الثعابين والحيتان والخنازير، حديثًا، اكتشفت كميات صغيرة من الأوفيدين فى لحوم الغنم وأثار من الأوفيدين فى لحوم الحيوانات الأخرى.

استخدام اختبار السريولوچى فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات من اللحوم الجاهزة لا تعطى نتيجة وذلك لفقد البروتين خواصه الطبيعية أثناء عملية الطبخ. العالمان تنسبرج وسليوم يستخدمون ratio بين الانسرين (anserine) إلى الكارنوسين (carnosine) فى التعرف على لحوم الدجاج فى لحوم اللانشون. ويستخدم الأوفيدين ophidine فى التعرف على لحوم الخنزير المطهية وفى المقانق وفى Tinned hams. كما تستخدم النسب بين الانسرين: الكارنوسين: الأوفيدين فى التعرف على لحوم الخنزير فى المنتجات الغذائية المحتوية على لحوم خنزير.

وفى هذه الدراسة يستخدم الأوفيدين للتعرف على لحوم الخنزير باستخدام طريقة الكروماتوجراف، كما يستخدم الانسرين والأفيدين فى التعرف على لحوم الخنزير فى tinned hams .

طريقة العمل:

١- المواد Materials

- ل - نيترات الانسرين
- ل - كارنوسين
- نيترو تيروسين
- مصل الألبيومين البقرى والأفيدين.
- لحوم الخنزير
- Tinned hams

٢- طريقة تحضير المستخلصات

١- تذبح الحيوانات وتؤخذ عينات اللحوم من الجانب الأيسر وتقطع إلى قطع صغيرة تزن كل منها ٢٠ جرام وتجمد فوراً فى نيتروجين سائل وتخزن عند درجة حرارة - ٢٠° س قبل التحليلات خلال أسبوعين.

والطريقة التى تستعمل مطورة من طريقة العالمان كوين وفيشر، وهى يوزن ٢ جرام من لحم الخنزير الأحمر من كل قطعة لحم مجمدة وتفرم فى محلول ملحى (٩ جرام كلوريد صوديوم فى اللتر 9 gm Nacl-liter-1; 2mlg-1 wet (weight مستخدما خلاط Sorrall omni - mixer عند ٨٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة دقيقة ولتجنيس ١٥٪ من ٥ - حمض سلفوساليسيلك 10 mlg-1 wet (weight يضاف إلى المخلوط ويخلط حتى يتجنس المخلوط ثم يدور فى جهاز الطرد المركزى عند ٦٠٠٠ لفة فى الدقيقة عند درجة حرارة ٥ س لمدة ساعة. يؤخذ الجزء الطافى ويرشح ثم يؤخذ ٥٠٠ ميكرولتر من الراشح ويضاف إلى الحامض الأمينى analyser لتعيين الهيستيدين المحتوى على ثنائى الببتيدات.

البروتينـات المترسبة تغسل مـرتين بواسطة ١٥ ٪ حمض السلفوسـاليـسيلك، والبروتين الخام الموجود فى أنسجـة اللحم تعين بواسطة biuret reaction المطور وهذا مفيد فى الاستخدام لتعيين حتـى البروتين غير الذائب. مصل الألبيومين البقرى يستخدم كقياس (as a standard)

٣- التحليل المائى (الحلمأة) للبروتين الخام:

تعيين ٣- مثـيل هيـستيدين يوزن ٣ مـلجم من البروتين الخام المحـلمأ خالى من الدهون فى ١,٠٠ مـلل من ٦٦ م حمض الهيدروكلـوريك لمدة ٢٢ ساعة عند درجة حرارة ١٠٥° س فى حوصلة (in vacuo) تجفف المادة المحلمأة طول الليل تحت تجـفيف مفرغ (vacuum desiccator) ثم يذاب فى ٦٠٠ ميـكرولتر من محلول ٠,٣٥م سترات الصوديوم المحايد (اس هيدروجينى ٢,٢)، يوضع ٤٠٠ ميكرولتر على الحامض الأمينى المحلل (analyser) لتعيين مادة ٣- مثيل هيستيدين.

٤- تغيير ايونات الكروماتوجراف Ion-exchange chromatogrophy

تحليل الهيستيـدين المحتوى على ثنائى الببتيد، ٣ مثيل هيـستيدين المتحصل عليـه من الحامض الأمينـى المحلل (analyser). حالة التجربة للتـحليل لثنائى الـببتيدات هى: محـلول محايد من سترات الصوديوم، ٠,٣٥ م فى الصوديم (اس هيدروجـينى ٥,٥٢)، ومعـدل تدفق ٦٠ ملل فى الساعـة، درجة حرارة العمود ٣٥ س لمدة ١٢٦ دقيقة الأول ثم ٥١° س لباقى التحليل وحجم العمود ٠,٩ سم × ٢٩ سم (Locart LA/49/36) كاتيون لتغيير الراتنج (resin).

تركيز محلول ٣- مثيـل هيستيدين المحلل يقاس باستخــدام نفس النظــام ما عدا المحلـولين المحايدين المسـتخدمين: محلـول محايد I (اس هيدروجـينى ٤,٢٦) ٣٥°س، ١٣٥ دقيقـة فى المحلول المحايد الـثانى II (أس هيدروجينى

(٥,٥٢) ٥١°س. المحلولين المحايدين لهم نفس قوة الايون (Ione strenght) ٣٥,٠م في الصوديوم. بعد سريان كل عمود مجدد بواسطة ٢,٠م هيدروكسيد الصوديوم لمدة ١٠ دقائق ويعادل المحلول المحايد المتوازن الأول عند درجة حرارة ٥٠° س. قمم الكروماتوجراف يتعرف عليها بالتطابق بواسطة مراجعة الأوقات. وأوضاع عينات القياس الداخلى الحقيقية [ل-نيتروتيروسين، ٢٥ نانومتر في ٥٠ ميكرولتر (اس هيدروجينى ٢,٢) يضاف إلى كل عينة مباشرة قبل وضعه فى جهاز التحليل.

٥- تحليل رقائق لحوم فخذ الخنزير (Linned hams)

لتقليل خطأ العينة من لحوم فخذ الخنزير، تجنس ٤٠ جرام من العينة بواسطة ٤٠ ملل من المحلول المحلى ثم يضاف ١٦٠ ملل من ٥- حمض السلفاسليسيلك (٨٠ جرام/ لتر) تضاعف المستخلصات المصنعة من لحوم فخذ الخنزير يؤخذ ٤٠ جرام من اللحم الطازج من رجل الخنزير زنة ٧٠ - ٨٠ كيلو جرام والتى عوملت بنفس الطريقة provide comparison تؤخذ عينات (٥٠٠ ميكرولتر) من المستخلصات ويحلل فيها هيستيدين ثنائى الببتيدات كما شرح سابقًا.

لتعيين المادة الجافة يؤخذ ١٠ جرام من العينة وتجفف فى فرن درجة حرارة ٨٥° س لمدة ١٨ ساعة ثم يكمل تجفيفها فى المجفف (desiccator).

النتائج والمناقشة:

١- مستخلص ثنائى الببتيدات المستخلص من اللحوم يقدر كميا بالحامض الأمينى المحلل (analyser) مستخدما المحلول المحايد من سترات الصوديوم (اس هيدروجينى ٥,٥٢) كما هو مبين فى الشكل (١)، كل مستخلص لثنائى الببتيد من اللحوم باستخدام محاليل محايدة منخفضة قيمة الأس الهيدروجينى،

أمونيا، ١ مثيل هيستدين، ٣- مثيل هيستيدين المفصولة مع بعض (eluted together) فى الدقيقة.

الكروماتوجراف الأولى توصل المحاليل المحايدة المختلفة عند درجات حرارة مختلفة يشير إلى انخفاض الأس الهيدروجينى للمحاليل المحايدة نتيجة ضعف الفصل بين الهيستيدين وثنائى الببتيدات وزيادة أوقات الفصل (elution). انخفاض درجة الحرارة يرفع من وقت الفصل (elution). بينما زيادة درجة الحرارة نتيجة تداخل للأحماض الأمينية وثنائى الببتيدات.

ولقد وجد العلماء أن فصل الهيستيدين، ٣ مثيل هيستيدين، ١- مثيل هيستيدين حساسة جداً لأى تغيير فى الأس الهيدروجينى (PH). وللحصول على أحسن نتائج يجب ثبات، وقوة الضبط للأس الهيدروجينى ودرجة حرارة المحلول المحايد. أقصى فصل للعمود من ٣- مثيل هيستيدين ينجز باستخدام محلولين محايدين ودرجتين مختلفتين من الحرارة.

يوجد أقل من ٥ ٪ اختلافات بين تكرار التقديرات لهيستيدين ثنائى الببتيدات فى نفس المستخلص. هذه الاختلافات بين محتويات الببتيد لنفس اللحوم من الخنزير ونفس لحوم مولود الخنزير قليلة (جدول ١)، من هذا يتضح أنه لا يمكن تقدير الأوفيدين بعد تحلل الرمى بواسطة الأنزيمات الموجودة فى لحوم الخنزير والمتروكة لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٤° س ولا يوجد اختلافات جوهرية فى محتوى العينات للأوفيدين الموجودة فى النيتروجين السائل مباشرة بعد الذبح.

٢- هيستيدين ثنائى الببتيدات فى لحوم الخنزير والأنسجة الأخرى تركيز الانسرين، الكارنوسين والأوفيدين تركيز الانسرين، الكارنوسين والأوفيدين وجد فى لحوم الخنزير عمر ٦ شهور (جدول ١) ولوحظ أن تركيز الأوفيدين

مرتفع فى لحوم العضلات. أعلى تركيز للأوفيدين يوجد فى عضلات Longissimus dorsi، semimembranosus للعضلات. عضلات القلب لا تحتوى على هيستيدين ثنائى الببتيدات وحدودية التقدير بهذه الطريقة محدود يصل إلى ٨,٠ ميكرومول للجرام بروتين. اللسان يحتوى على كمية قليلة من الأوفيدين وقد يرجع ذلك إلى محتوى البروتين الكثير فى non-myofibrillar كما فى الأنسجة الضامة.

ولم يظهر وجود هيستيدين فى عينة وزنها ٢ جرام من مخ الخنزير، المعدة، الأمعاء الدقيقة والطحال. ووجد الكارونوسين فى كبد وكلى لحوم خنزير عمر ٦ شهور يصل إلى ٤,٥، ١,٨ ميكرومول فى الجرام من البروتين بالتابع ولم يلاحظ وجود أنسرين أو أوفيدين. كما وجد كارنوسين فى بلازما الدم بتركيز ٣٨,٠ ميكرومول فى ملل ولم يلاحظ أنسرين أو أوفيدين.

٣- الأوفيدين فى الأنواع المختلفة من اللحوم: لحوم عظم فك الحوت يحتوى على تركيز عالى من الأوفيدين فى عضلة dorsi ويصل إلى > ٣٠٠ ميكرومول فى جرام البروتين بينما الحيوانات المنوية للحيتان تحتوى على >١ ميكرومول فى جرام البروتين. كما وجد فى عينة عشوائية من لحوم الحيتان والدولفينات تحتوى على تركيز عالى وواضح أنه يصل إلى >١٠٠ ميكرومول فى جرام البروتين. وتركيز الأوفيدين فى لحوم الثعابين يختلف تبعًا لأنواعها، ثعابين البحار تحتوى على تركيز عالى يصل إلى ١٦٠ ميكرومول للجرام بروتين) عنها فى الثعابين الأرضية (يصل فيها من ١٠ - ٨٠ ميكرومول لجرام البروتين).

فُحصت ٦ أنواع من أسماك لصفيحة الخيشوم وجد الأوفيدين فى عضلة L.dors عند تركيز يتراوح من ٠٦,٠ - ٦,٢ ميكرومول لجرام البروتين،

والأوفيدين أيضًا موجود فى مستخلص لحوم التونة (bigeye & yellowfin) (١-٢ ميكرومول لجرام البروتين).

الأنواع الأخرى من الأسماك العظمية لم يلاحظ فيها الأوفيدين. كميات صغيرة من الأوفيدين لوحظت فى لحوم الأغنام والفصيلة البقرية (١-٣ ميكرومول لجرام البروتين). وبعض العلماء وجدوا بالكاد الأوفيدين فى لحوم الفئران والأرانب والإنسان (< ١٣, ٠ ميكرومول لجرام البروتين).

الدراسة الأولية لعينة ٢ جرام من لحوم البقر والأرانب والدجاج والكانجارو لا يوجد بها أوفيدين ولكن وجد الأوفيدين فى لحوم الأغنام (١ ميكرومول لجرام البروتين).

٤- تغييرات فى الهيستيدين ثنائى الببتيدات مع العمر: معظم الأوفيدين فى أنواع لحوم الخنزير تزداد بالعمر (شكل ٢) عضلة L.dorsi يوجد بها زيادة عند I ميكرومول لجرام البروتين فى لحوم الولادات الحديثة من الخنازير وإلى ٧٢ ميكرومول بروتين تقريبًا فى الخنازير التى عمرها ٨ سنوات. العلاقة بين ثنائى الببتيدات والانسرين والكارنوسين والأوفيدين فى عضلة L. dorsi من لحوم الخنزير كما هو مبين فى شكل (٣) بقايا الانسرين تظل ثابتة مع العمر تقريبًا، بينما الكارنوسين يرتفع سريعًا فى خلال السنة الأولى من النمو ثم يثبت بعد ذلك، أما الأوفيدين الوحيد من ثنائى الببتيد يزداد بالعمر. كذلك لحوم الجهاز العظمى يوجد بها كما هو فى عضلة L.dorsi.

لا يوجد تغيير ذات دلالة فى ٣-ميثل هيستيدين الموجود فى بروتينات لحوم الخنزير فى أعمار مختلفة بين ٣ سنوات و٨ سنوات. ومحتوى ٣- ميثل هيستيدين فى عضلة L.dorsi هو ٥,٦ ± ٠,١ s.e.m ميكرومول فى جرام

البروتين وفـى عضلة gastronemius هـو ٥,٧ ± ١,٠ ميـكرومول فـى جرام البروتين.

من النـتائج الموجـودة فى شكل (٢) يرى مـعدل التجمـيع للأوفيـدين فى عضلة L.drosi للخنزير تقريبًا ٢٥ نانومول فى جرام البروتين فى اليوم.

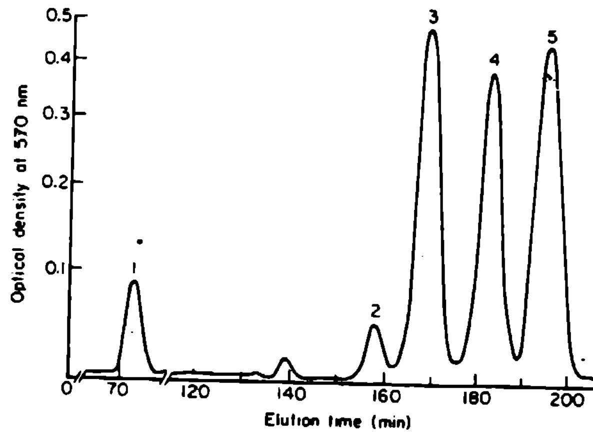
ووجد العلماء عن حقن ٣-ميـثل هيستيدين فقط ٣٪ تخرج مع الـبول فى اليوم والباقى يـبقى فى اللحوم على هيـئة أوفيدين. على العكس فـى الفصيلة البقـرية والإنسان والـفئران والأرانب وجد أن ٣-مـثيل هيـستيدين يـخرج من أجسامهم بسرعة وهذا يدل على اخـتلاف طريقة خروج الأوفيدين خارج خلايا اللحوم المختلفة للخنزير.

٥- مقارنة لحوم فـخذ الخنزير Comparison of Rams تحتوى لحـوم فخذ الخنزيـر من الانسريـن، كارنوسين والأوفيـدين مبين فـى جدول (٢) وجد أن محتوى الأوفيدين هو نفس الموجود فى عيـنة اللحوم الطازجة من رجل الخنزير عمر ٦ شهور.

نسبة محتوى لحوم Tinned Leg والكتف من الانسرين والأوفيدين مبين فى شكل (٤).

الأوفيدين يمـكن تقديره بـسـرعة كما أن نسبـة الانـسرين إلى كارنـوسين فى لحوم الخنـزير تختلـف عن أنواع اللحـوم المختلفـة كما هو مبـين فى رقم (٣) هيستـيدين ثنائى البـبتيدات قد يفيـد فى التعرف على الـلحوم المختلفة المـصنعة وجوده منتجات لحوم الخنزير تعتمد على تحليل الهيستيدين ثنائى البتيدات.

Figure 1. Separation of histidine dipeptides from the *bicep femoris* muscle of an 8-year-old sow. Operating conditions are as described in section 2.4. 1. nitrotyrosine (73 min); 2. anserine (157 min); 3. carnosine (170 min); 4. ophidine (182 min); ad 5. ammonia, 1-methyl-L-histidine, 3-methyl-L-histidine (191 min).



شكل (١)

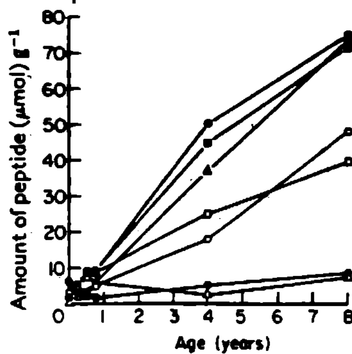


Figure 2. Effect of age on the ophidine content of pig muscles: ▲, *bicep femoris*; ■, *longissimus dorsi*; ●, *semimembranosus*; △, *masseter*; ⊙, tongue □, *gastrocnemius*; ○, *trapezius*; muscle.

شكل (٢)

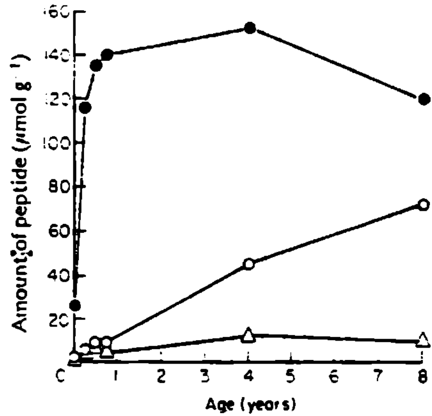


Figure 3. Effect of age on the content of histidine dipeptides in the *longissimus dorsi* muscle of the pig: △, anserine; ●, carnosine; and ○, ophidine.

شكل (٣)

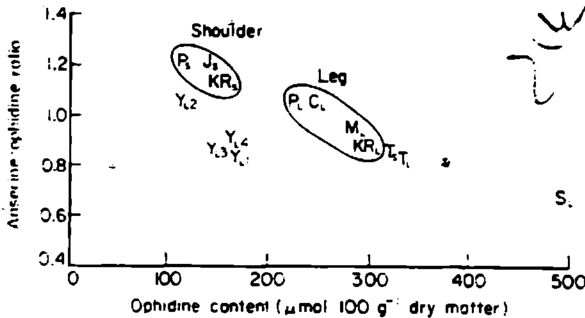


Figure 4. Ophidine content and anserine: ophidine ratio of shoulder (S) and leg (L) hams. The differences between the Yugoslavian shoulder and leg hams were significant at the 0.001 % level, as determined from a simple linear function estimated by ordinary least squares regression which explained 86 % of the variation in the ratio.

شكل (٤)

المراجع:

1. Bricas, E.; Fromageot, C. Naturally occurring peptides. *Adv. Protein Chem.* 1953, **8**, 1-125.

2. Crush, K. G. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 1970, **34**, 3-30.

3. Suyama, M; Suzuki, T.; Maruyama, M.; Saito, K. Determination of carnosine, anserine, and balenine in the muscle of animal. *Bull. Jpn Soc. Sci. Fish.* 1970, **36**, 1048-1053.

4. Imamura, H. Chemie der Schlangen. I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Schlangenmuskeln. *J. Biochem. (Tokyo)* 1939, **30**, 479-490.

5. Kendo, K. Über die Konstitution des Ophidins, eines N-haltigen. Extraktivstoffes der Schlangenmuskel. *J. Biochem. (Tokyo)* 1944, **36**, 265-276.

6. Tsunoo, S.; Horisaka, K.; Motonishi, K.; Takeda, J. Über das Ophidin in den Muskeln von den Sweeschlangen *Laticauda semifasciata* und *laticaudata*. *J. Biochem. (Tokyo)* 1964, 56, 604-606.

7. Pocchiari, F.; Tentori, L.; Vivaldi, G. The presence of the dipeptide β-alanyl-3-methylhistidine in whale meat extract. *Scientific Reports of the Istituto Superiore di Sanità* 1962, **2**, 188-194.

8. Nakai, T.; Tsujigado, J.; Akiya, S. Extractives from muscle meat of *Balaenoptera physalus* (Linnaeus). *J. Biochem. (Tokyo)* 1963, **54**, 541-549.

9. Cocks, D. H.; Dennis, P. O.; Nelson, T. H. Isolation of 3-methyl

histidine from whalemeat extract and the preparation of some derivatives. *Nature (London)* 1964, **202**, 184-185.

10. Dennis, P. O.; Lorkin, P. A., Isolation and synthesis of balenine, a dipeptide occurring in whale-meat extract. *J. Chem. Soc. (Lond.)* 1965, 4968-4972.

11. Tsunoo, S.; Horisaka, K.; Tanabe, H.; Murata, M.; Takahashi, S.; Musashi, A.; Tanabe, J. Über die aus Verschiedcnen-Delphinen-muskeln Isolierten β-alanyl - dipeptide und über ihre Pharmakologischen Wirkungen. *Jpn J. Pharmacol.* 1966, **16**, 98-109.

12. Rangeley, W. R. D.; Lawrie, R.A. Methylamino acids as indices in meat products. I. The development and validity of an analytical procedure. *J. Food Technol.* 1976, **11**, 143-159.

13. Rangeley, W. R. D.; Lawirie, R. A. Methylated amino acids as indices in meat products. II. Further examination of protein sources and the practical application of methylamino acid titres in predicting meat content. *J. Food Technol.* 1977, **12**, 9-26.

14. Harriss, C. I.; Milne, G. The inadequacy of urinary J^{T}-methylhistidine excretion in the pig as a measure of muscle protein breakdown. *Br. J. Nutr.* 1981, **45**, 423-429.

15. Harris, C. I.; Milne, G. The urinary excretion of N^{T}-methylhistidine - in sheep: an invalid index of muscle protein breakdown. *Br. J. Nutr.* 1981, **45**, 423-429.

16. Harris, C. I.; Milne, G. The occurrence of the N^{T}-methylhistidine - containing dipeptide, balenine, in muscle extracts of various mammals. *Biochem. Soc. Trans.* 1980, **8**, 552.

17. Nakai, T.; Tsujigado, N. β-Alanyl dipeptide preparations from whale muscccles made by several workers. *J. Biochem. (Tokyo)* 1965, 57, 812-814.

18. Wolff, J.; Horisaka, K.; Fales, H. M. On the structure of ophidine. *Biochemistry* 1968, 7, 2455-2457.

19. Suyama. M.; Maruyama, M. Identification of methylated β-alanylhistidine in the muscles of snake and dolphin. *J. Biochem. (Tokyo)* 1969, **66**, 405-407.

20. Tinbergen, B.J.; Slump, P. The detection of chicken meat in meat products by means of the anserine/carnosine ratio. *Z. Lebensm-Unters-Forsch.* 1976, **161**, 7-11.

21. Quinn, M. R.; Fisher, H. Effect of dietary histidine on olfaction, and rat brain and muscle concentration of histidine - containing dipetides. *J. Neurochem.* 1977, 29, 717-728..

22. Haverberg, L. N; Omstedt, P. T.; Munro, H. N.; Young, V. R. N^{T}-methylhistidine content of mixed proteins in various rat tissues. *Biochim. biophys. Acta* 1975, **405**, 67-71.

23. Goshev, I.; Nedkov, P. Extending the range of application of the biuret reaction: quantitative determination of insoluble proteins. *Anal. Biochem.* 1979, **95**, 340-343.

24. Zarkadas, C. G. A simple chromatographic method for the determination of the methylated basic amino acids in proteins. *Can. J. Biochem.* 1975, **53**, 96-101.

25. Harris, C. I.; Milne, G. The urinary excretion of N^{T}-methylhistidine by cattle: validation as an index of muscle protein breakdown. *Br. J. Nutr.* 1981, 45, 411-422.

26. Long, C. L.; Haverberg, L. N.; Young, V. R.; Kinney, J. M.; Munro H. N.; Geiger, J. W. Metabolism of 3-methylhistidine in man. *Metab. Clin. Exp.* 1975, 24, 929-935.

27. Young, V. R.; Alexis, S. D.; Baliga, B. S.; Munro, H. N; Muecke, W. Metabolism of administered 3-methyl- histidine. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative. *J. Biol. Chem* 1972, 247, 3592-3600.

28. Harris, C. I.; Milne, G.; Lobley, G. E.; Nicholas, G. A. 3-Methylhistidine as a measure of skeletal-muscle protein catabolism in the adutlt New Zealand white rabbit. *Biochem. Soc. Trans.* 1977, 5, 706-708.

الكشف عن الخواص الجزيئية لبروتينات
لحوم الخنزير بالهجرة الكهربائية للمناعة فى الأجاروجيل

Detection and partial characterization of soluble pig muscle proteins by immunoelectrophoresis in agaros gels.

C. Casas, J. Tormo, P. E. Hernandez and B. Sanz J. of food Technology, 1984, 19, 283-287.

الكشف عن الخواص الجزيئية لبروتينات لحوم الخنزير بالهجرة الكهربائية للمناعة فى الأجاروزجيل

أساس الطريقة:

تلوث منتجات اللحوم المفرومة والمحتوية على خضروات (parsons & Lowire 1972) أو بروتينات حيوانية (Deschreider & Meaux, 1974) لم يتضح تركيباتها فى هذه المنتجات، الاختبار السريع البسيط يستعمل قدر الإمكان لتعيين الإضافات غير المعلومة من اللحوم فى المنتج والتى تعطى المستهلك حماية أكبر.

- مناعيًا، يمكن بها تميز بروتينات الحيوانات المختلفة مستخدمًا الأمصال المضادة لبروتينات اللحوم أو لمصل الدم (warnecke & saffle, 1968).
- المجهودات لتعيين حزمة البروتينات الخاصة للبروتينات الذائبة من لحوم الخنزير، والخالية من التداخل التفاعلى مع البروتينات الذائبة من لحوم البقر، الخيل، والدجاج بطريقة الهجرة الكهربائية للمناعة فى الأجاروزجيل.

حزمة البروتينات الخاصة تظهر وجود لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم فى أول وقت للهجرة الكهربائية للمناعة بمضادات (البروتينات الذائبة).

المواد والطرق المستخدمة:

تحضير مستخلصات الانتيجين

يوزن ٢٥٠ جرام من عضلات الخنزير (Ms. intercostalis extemi and Ms. trapezius) ومن عضلات الخيل (Ms. glutaeus superficialis and Ms. biceps femoris) ومن عضلات البقر (Ms. rectus femoris, MS. vastus lat-

eralis) ومن عضلات الدجاج (Ms. pedoralis and Ms. supracoracoideus) تسحق وتفرم وتجنس وتوضع فى ٥٠٠ ملل من محلول ملحى ٠,٠٨٥ ٪ . البروتين الذائب يستخلص بثبات التحريك والتجنيس لمدة ساعة عند درجة حرارة ١°س. مستخلصات البروتين ترشيح من خلال ورق ترشيح وات مان رقم ١، ويجفف بالتجميد والمستخلصات الجافة توضع فى صناديق مقفلة جيداً وتحفظ عند درجة حرارة -٢٠° س حتى الاستخدام.

تحضير الأمصال المضادة:

مصل يحتوى على أجسام مضادة لأمصال بروتينات الخنزير (PSP) والمتحصل عليها بحقن ذكر أرنب النيوزيلاندى تحت الجلد بجرعات منفردة من مستخلصات بروتين الخنزير الجاف بالتجميد (٤٨ ملجم) فى ٢ ملل من ماء مقطر متأين emulsified فى ٠,٥ ملل من مذيب Freund. ١٥ جرعة booster تعطى تحت الجلد كل ٤ أيام لمدة ٦٢ يوم. تنزف الأرانب من حين لآخر من الوريد الأذنى ويترك الدم يتجلط عند درجة حرارة الغرفة ثم يبرد عند درجة حرارة ٤° س لمدة ١٨ ساعة. مضادات الأمصال تصب وتدور فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٠ دقائق لإزالة بقايا الخلايا الدموية الموجودة.

تحضير الأجاروزجيل:

أساس طريقة التحضير جربر، ويليام ١٩٥٣ والمعدلة بواسطة شدجر ١٩٥٥.

- ١ ٪ أجاروزجيل فى محلول محايد من الفيرونال (مادة منومة)، أس هيدروجينى ٨,٦.

- يخرم الجيل بواسطة قاطع الحفر إلى حفر قطرها ١مم، شريط ٢,٠ × ٢ سم.
- يوضع ١ ميكرلتر (٢٤ ميكروجرام) من مستخلص الانتيجين فى الحفر.
- الشرائط توضع فى جهاز الهجرة الكهربائية (electrophoresis) لمدة ٤ ساعات عند ١٣٠ ڤولت.
- تملأ الشرائط المعدنية بواسطة ٣,٠ ملل من الأمصال المضادة المقابلة.
- ينجز الانتشار المناعى من ١٨ - ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧° س.
- شرائط البروتين المترسبة ترى بواسطة الأميد الأسود (مركب ناتج عن إحلال مجموعة حامض عضوى محل ذرة الهيدروجين فى جزئ النشادر) (clausen, 1981)
- الخواص الجزيئية للكيمياء المناعية لهذه الشرائط تشمل فى الكشف عن جزيئات الجليكوبروتين تبعًا لطريقة نادى (NADI'S) (Clousen, 1981) وجزيئات الليبوبروتين بالسيودان الأسود (sudan black) (uriel Avrameas & Grabar, 1963).
- درجة الإزاحة نسبيًا لكل شريط لمصل الألبيومين البقرى يستخدم كمعيار (كمقياس) وتعين كالتالى:

$$\text{الانتقال المطلق} = \frac{\text{إزاحة للشريط (مم)}}{\text{حجم/ مم/ ثانية}}$$

$$\text{absolute mobility} = \frac{\text{band displacement (mm)}}{\text{v/mm/sec}}$$

الانتقال النسبى = إزاحة الشريط (مم) / إزاحة مصل الألبيومين البقرى (مم)

$$\text{absolute mobility} = \frac{\text{band displacement (mm)}}{\text{bovine serum albumin displlacement (mm)}}$$

٪ الانتقال = الانتقال النسبى × ١٠٠

% mobility = relative mobility x 100

النتائج ومناقشتها:

- الكشف عن حزمة البروتين الذائب من بروتينات الخنزير، التفاعلات التداخلية الحرة ببروتينات الخيل الذائبة، ومستخلصات البروتينات الذائبة والمجففة بالتجميد لكل من البقر والدجاج والتى يتم تحليلها بواسطة جهاز الهجرة الكهربائية للمناعة (Immuno electrophorosis) فى الأجاروزجيل ضد الأمصال المضادة لبروتينات الخنزير الذائبة المنتجة من الأرانب.

- مستخلصات البروتين الذائبة للحوم الخنزير والمجففة بالتجميد يعمل لها تحليل ضد مضادات الأمصال المتجنسة allowed والمستخدمة فى تقدير النسب المئوية لإزاحات ٦ أنواع من حزم البروتين المترسبة وهى بين ١٦ ± ٠,٠٤ ، ٧٥ ± ١,٧٠ (جدول ١ وشكل ١) ثلاثة حزم من الست حزم wer arbitrarily defired asmamjor bands ترجمة (شرائح ١ ، ٤ ، ٦) بالصبغة القوية للأميدو الأسود (Amido black). أما الثلاثة الباقون من الشرائط (شريط ٢ ، ٣، ٥) والمعروفة كشرائط صغيرة لضعف صبغتها بنفس الصبغة السابق ذكرها.

الخواص الجزئية للمناعة الكيميائية (جدول ٢) للشرائح يتعرف عليها

بوجود أجزاء من الجليكوبروتين والليبوبروتين فى تركيباتها الناتجة فى شريط واحد فقط من الجليكوبروتين (شريحة ٥).

عند تحليل مستخلصات بروتينات لحوم الخيل والمجففة بالتجميد ضد الأمصال المضادة لمصل بروتين لحوم الخنزير، لوحظ وجود ٤ شرائط من البروتينات المترسبة لها نسبة مئوية من الإزاحات ١٦ ± ٠,١٠، ١٧ ± ٠,٣٤، ٣٣ ± ١,٤٣، ٣٧ ± ٠,٩٩ (شكل ١). أثناء تحليل مستخلصات بروتينات لحوم الدواجن ضد نفس المصل المضاد لمصل بروتين لحوم الخنزير، وجد نسبة الإزاحة المئوية لثلاثة شرائط هى ١٦ ± ٠,١٨، ٣٣ ± ٠,٧٤، ٤٨ ± ١,٠٢ . أثناء تحليل مستخلصات بروتينات لحوم البقر ضد المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير وجد النسبة المئوية للإزاحة لاثنين من الشرائط هى ١٧ ± ١,٤٢، ٣٧ ± ٠,٨٧ . كل هذه الشرائط إزاحتها تقفل عن شرائط ١، ٢، ٣، ٤، ٥ للبروتينات الذائبة من لحوم الخنزير ضد المصل المضاد لمضادات البروتينات الذائبة للحوم الخنزير، استجابتهم قد تكون للتفاعلات الإيجابية المضللة حين محاولة التحليل الكمى لمختلف المستخلصات المختلفة لبروتينات الحيوانات بواسطة الانتشار المناعى (Gabucci & Flego, 1975). وأنها أيضًا مهمة للتأكد بأن معظم شريط ٦ للبروتينات الذائبة للحوم الخنزير مضادة ضد المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير، خاصة شريط بروتين الخنزير المترسب لا يظهر عندما تكون مستخلصات بروتين اللحوم للخيل، البقر، الدجاج عند تحليلها ضد نفس المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير.

هذه خاصية شريط بروتينات الخنزير هذه قد تدل على وجود لحوم الخنزير فى المنتجات، عندما تكون مستخلصات البروتينات الذائبة تحلل ضد المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير، نظريًا، هذا البروتين لابد من وجوده فى أى نوع مذاب ومتجانس فى بروتين لحوم الخنزير مهما كانت تركيب الخليط.

- استخدام جهاز الهجرة الكـهربائية للمناعة (Immunoelectrophoresis) فى الأجـاروزجيل للـتفريق بـين البروتيـنات المختلـفة من الحيـوانات المختلـفة باستخدام الأمصال المضادة ضد أمصال الـبروتينات كمرجع يحتذى به (karpas, Myer & Segre, 1970) هذا يدل على اسـتخدام الأمصال المضادة للـبروتينات الذائبة مكان مضـادات الأمصال ضد مصل البروتين قد يبرهـن على هذا العمل ويرجع إلى صرامة تحليـل بروتينات اللحوم الذائبة ضد البروتـينات غير الذائبة. بروتينات اللحوم الذائبة ضد مصل بروتينات الدم. واقعية استخدام هذا التكنيك عندما يطبق على خليط من اللحـوم المركبة الموجودة فى اللحوم المخلوطة (مثل البيض، اللبن، بروتينات الخضروات لم تؤكد صحتها إلى الآن).

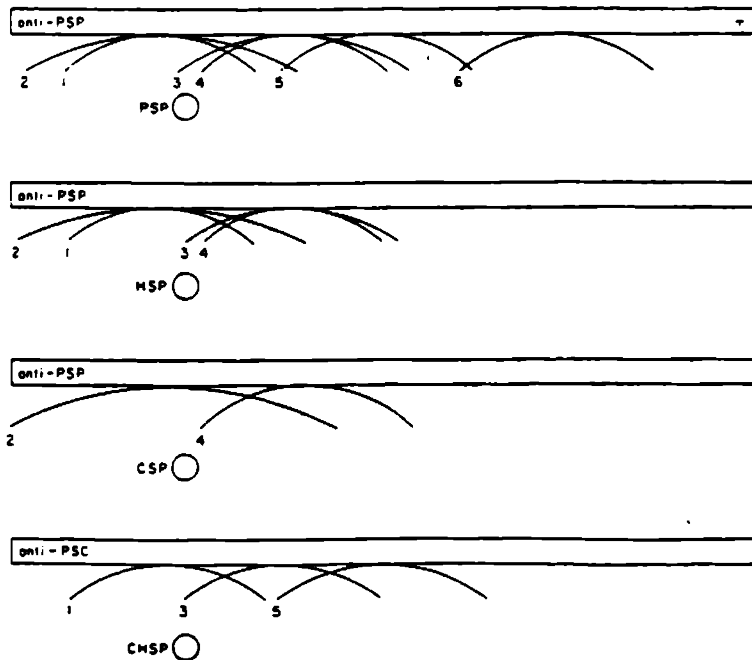


Figure 1. Patterns of protein precipitin bands of different animal soluble muscle proteins against a soluble pig muscle protein antiserum (anti-PSP). PSP, pig proteins; HSP, horse proteins; CSP, cow proteins; CHSP, chicken proteins.

شكل (١)

Table 1. Absolute, relative and percent mobilities of protein precipitin bands of soluble pig muscle proteins (PSP) against a rabbit homologous antiserum (anti-PSP)*

Precipitin band (No.)	Band displacement (mm)	Absolute mobility	Relative mobility	Percent mobility
1	6.0	0.69±0.06	0.16	16±0.04
2	6.5	0.75±0.06	0.17	17±1.03
3	12.5	1.44±0.22	0.33	33±1.32
4	14.0	1.62±0.17	0.37	37±1.09
5	18.0	2.08±0.20	0.48	48±0.66
6	28.0	3.24±0.38	0.75	75±1.70
B. albumin	37.0	4.28±0.34	1.0	100
Dextrane	0.0	0.0	0.0	0.0

*The degree of displacement of each band relative to bovine serum albumin used as standard, was defined as stated in Materials and methods.

جدول (١)

Table 2. Detection and immunochemical characterization of protein precipitin bands of pig soluble muscle proteins (PSP) against a rabbit homologous antiserum (anti-PSP)

Immunization period		Precipitin bands (band No.)		Immunochemical characterization (band No.)	
Bleeding	Days	Major	Minor	Glycoproteins	Lipoproteins
B1	12	1	—	—	—
B2	28	1, 4, 6	—	—	—
B3	48	1, 4, 6	2, 3, 5	5	—
B4	62	1, 4, 6	2, 3, 5	5	—

جدول (٢)

المراجع:

Clausen, J. (1981). In *Immunochemical Techemical Techniques for the Identification and Estiimation of Macromolecules*. (Ed. by T. S. Work & E. Work). Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Deschreider, A. R. & Meaux, R. (1974). *Industries Alimentaires et Agricoles*, **91**, 101-106.

Gabucci, G. && Flego, L. (1975). *Bolletino dei Chimici dei Laboratori Provinciali di Trieste (Italia)*, **7**, 236-240.

Grabar, P. & Williams, C. A. (1953). *Biochimica Biophysica Acta,* **10**, 193-202.

Karpas, A. B., Myers, M. L. & Segre, D. (1970) *Juronal of Food Science*, **35**, 150-155.

Parsons, A. L. & Lawrie, R. A. (1972). *Journal of Food Technologgy,* **7**, 455-462.

Scheidegger, J. J. (1955). *International Archives of Allergy and Applied Immunology,* **7**, 103-110.

Uriel. J., Avrameas, G Grabar, P. (1963). In: *Protides of the Biological Fluids*. (Ed. by J. Peeters). Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Warnecke, M.O. & Saffle, R. L. (1968). *Journal of Food Science*, **33**, 131-135.

التعرف على اللحوم فى المنتجات الغذائية

Techincal note: The identification of Meat in food products.

I. HIBBERT and R. A. LAWRIE.

J. Fd Technol, 7, 333-33, 1972.

التعرف على اللحوم فى المنتجات الغذائية

تعيين محتويات اللـحوم فى المنتجات الغذائية بعد تجهيزهـا، الطريقة تعتمد على جهاز جيل الهجرة الكهربائية gel electrophoresis للتعرف على كمية أنواع اللحـوم المختلطـة بعد معامـلتها حـراريا إلى ١٢٠° س لـمدة ٣ - ٦ دقـائـق (Mattey, parsons & Lawrie, 1970)، هذه الطريقـة تحقق من تغيير طـبيعة البروتين الأصلية وتركـيزها فى المنتجات التى تعرضت للـحرارة مدة طويلة أثناء التجهيز (parsons & Lawie, 1972) حينما يكون التعرض شديد وكافى، تكسير الـبروتـينـات هى مـفتـاح التـعـرف بأى طـريقـة. إذا وجد بـعض مـكونـات Myofibrillar proteins وهى خاصـية مركب اللـحوم الوحيدة لـلتعرف علـيها وخصائصها الكيميائية غير مصقولة.

الأبحاث الحديثة تشاهد ٣- مـثيل هيستيدين (3-methylhistidine) هو من المحتوى الطبـيعى للتفاعل والمـيوسين فى عضلات الحيوانـات الكبيرة Johnson etal 1967، Johnson & perry 1970. إذا كان الحمض الأمـينى Amino acid غائب من الـبروتينات غير الحـيوانية المصدر كـما هو موجود فى المواد الـغذائية طريقة Johnson et al 1967 لتـعيين ٣- مثـيل هيـستيديـن فى Myofibrillar protein المعزول من العـضلات والتى تطبق مع بـعض التطوير البسـيط لها إلى التحليل المائى (الحلـمأه) لعناصر اللحوم والتى قد تستخدم فـى منتجات اللحوم وخليط لحوم الأبقار وفول الصويا.

يوضع من ١ - ١,٥ جرام فى ٢٠٠ ملل حمض الهيدروكولريك لمدة ٢٤ ساعـة وهذه الطريقة لا تـكسر ٣- مثيل هيسـتيدين عند إضـافة التحليـل المائى (الحلمأه) تبرد ثم ترشح من خلال ورق ترشيح وات مان نمره ٤٢ ويخفف إلى ٢٥٠ ملل وذلك لمحتواه المـنخفض من ٣- مثيل هيستيـدين فى المواد المدروسة

وجد أنه من الضرورى تركيز حتى ٧٥ ملل من الحلماه فى مجفف دوار وذلك لكل عزله كروماتوجراف واحدة.

وفى النهاية يوضع فى عمود ٣٠ × ٠٦ , للتكنكون كروميد (Technicon chromobeads) ويستخدم عند درجة حرارة ٣٠° س ويجمع ٨, ٠ ملل من Fractions بواسطة جهاز LKB المطور مع عمل ضغط من الهواء أو النيتروجين ٢٥ psi معدل الانسياب ١٥ ملل/ الساعة. تحت هذه الظروف ٣- مثيل هيستيدين يظهر واضح المعالم عند القمة الهستيدين فى ca.100ml ولإظهار اللون يوضع نين هيدرين (Ninhydrin). إجمالى النيتروجين يعين بواسطة ماكروديجستين وميكروديستلات macrodigestion & microdistillation محتوى عينات اللحوم من الأبقار والأغنام والخنازير من ٣- مثيل هيستيدين كانت ٥-٦ ملجم/ جم من إجمالى النيتروجين. هذه القيمة هى نفس المطلوب المحسوبة رياضيا على قاعدة المحتوى المعزول Myofibrillar protein من ٣- مثيل هيستيدين وتركيز المحتوى المعزول من Myofibrillar protein فى بروتينات القمح، وفول الصويا والكازين والجيلاتين لا تكتشف حتى لو استخدم تركيز ٢٠ مرة من الحلماه المستعملة مع اللحوم.

حينما تطبق الطريقة لمخالط اللحوم البقرية وفول الصويا والتى تعبأ فى علب معقمة، يوجد علاقة مقنعة بين العيار الحجمى ٣-مثيل هيستيدين ونسبة اللحوم فى المخلوط (جدول ١).

تعيين تركيز ٣ مثيل هيستيدين كملجم/جم مجموع N فى عينة مجهولة سويا مع معلومات عن مجموع N فى اللحوم (Anon, 1961, 1963) يسمح بظهور حساب النسبة المئوية للمحتوى وذلك لوجود اللحوم.

الطريقة يمكن استخدامها بوضوح حتى مع الحلماه (التحلل المائى) للمنتجات.

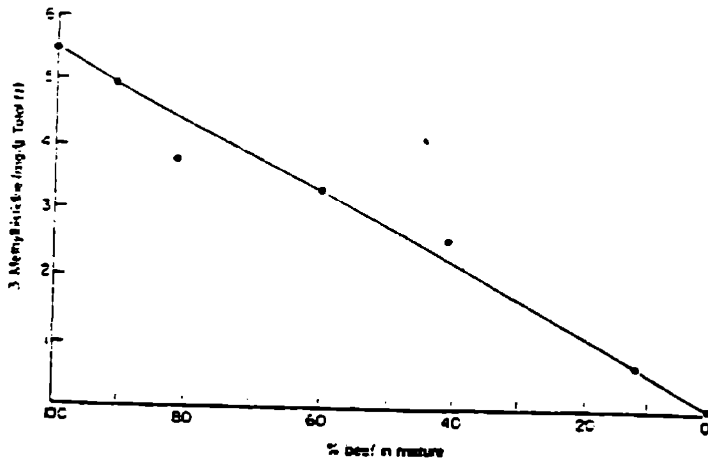


FIG. 1. Relationship between percentage of beef and 3-methylhistidine titre (as mg/g total nitrogen) in mixtures with texturized soya protein after subjection to canning under conditions required for commercial sterility.

شكل (١)

المراجع:

ANON, (1961) *Analyst, Lond.* 86, 557.

ANON, (1961) *Analyst, Lond.* 88, 422.

JOHNSON, P., HARRIS, C.I. & PERRY, S.V. (1967) *Biochem. J.* 105, 361.

JOHNSON, P. PERRY, S.V. (1970) *Biochem. J.* 119, 293.

MATTEY, M., PARSONS, A.L. && LAWRIE, R.A.(1970) *J. Fd Technol.* 5, 41.

PARSONS, A.L.& LAWRIE, R.A. (1972) *J. Fd Technol.* (In press).

الفصل الرابع

الكشف عن دهون الخنزير

فى المنتجات الغذائية

الفصل الرابع
الكشف عن دهون الخنزير فى المنتجات الغذائية

أساس الطريقة :

التركيب الـكيميائى لدهن الخـنزير ودهون الحيوانات الأخرى مـتشابه جداً ولتحديد دهن الخنـزير فى الدهون الأخرى والمنتجات الغذائية يـكون فى منتهى الصعـوبة إذ كانت كـميته صـغيرة جداً ولـذلك يتطـلب طريقـة حساسة لـهذا الغرض.

وتعـتمد الطـريقة عـلى اختلاف أنـتشار حمـض البالمـتيك فى المـوضع ، للـجلـيسـريدات الـثلاثـية فى دهـن الخنـزير والـدهون الأخـرى للـحيـوانات والخضروات ويحتوى دهن الخـنزير على أكبر كمية من حمض الـبالمتيك وتقدر بأربعة أضعاف تقريباً عنه فى الدهون الأخرى .

ويمكن بهذه الطريقة تـقدير دهن الخنزير عند ٥ ٪ فأكثر عند خـلطه بدهون الحيوانـات الأخرى مثل دهن الـبقر والغنـم والزبد وهذه التـجربة تطبـق على الـزيوت والـدهون التـى يكـون لهـا نقطـة انصـهار أقـل من ٤٥ ° س بسـبب الخصوصية لمفعول إنزيم البنكرياتيك ليبار .

وهذه التجربة لا تنطبق على الزيـوت والدهون المحتوية على أحماض دهنية غير مشبعة بكمية عالية (بأكثر من أربعة أضعاف الروابط) وتحتوى على ٢٠ ذرة كربون أو أكثر (زيوت الـسمك والحيوانات البحرية) أو الأحماض الـدهنية التى تحتوى على مجمـوعات أكـسجين عنها فى مجموعات الأحمـاض والمنتجات التى تحتـوى على دهن الخـنزير المطـور (المعدل) وتحـتوى الطريـقة على الخـطوات التالية:

١ - استخلاص الدهن من المنتجات الغذائية .

٢ - تنقية الجليسريدات الثلاثية بعمود الكروماتوجراف .

٣ - تحضير ٢ - الجليسريدات الأحادية من الجليسريدات الثلاثية بالتحليل المائى بإنزيم بنكرياتيك ليپاز .

٤ - فصل ٢ - الجليسريدات الأحادية بجهاز الكروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة.

٥ - تصبين وتأستر الجليسريدات الثلاثية ، ٢ - الجليسريدات الأحادية .

٦ - فصل وتقدير استرات المثيل للأحماض الدهنية بواسطة جهاز الكروماتوجراف السائل الغازى .

٧ - حساب الصورة الجانبية للحمض الدهنى ، حمض البالمتيك .

الكواشف :

١ - إيثانول ٩٥ ٪ جم / جم

هكسان أو بترولين خفيف (٣٠ - ٦٠° س)

٢ - بروبانول ٥٠ ٪ (حجم/ حجم) أو إيثانول ٥٠ ٪ (حجم/ حجم) محلول هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عيارى .

- محلول فينول فيثالين ١ جرام/ ١٠٠ مليلتر سائل فى ٩٥ ٪ إيثانول جم/ جم

- اليومينا طبيعية نشطة لجهاز الكروماتوجراف

- بركامات نشط ١ ، ينشط حديثاً لمدة ساعتين عند ٢٦٠° س ويترك فى

مجفف .

- ميثانول
- ثنائى إيثيل ايثر بيروكسيد
- كبريتات الصوديوم اللامائية
- سائل حمض الهيدروكلوريك ٦ عيارى
- محلول شولات الصوديوم ١ جرام/ لتر محلول مائى
- محلول كلوريد الكالسيوم ٢٢٠ جرام/ لتر
- محلول محايد ١ إم محلول مائى من ثلاثى هيدروكسى مثيل أمينو ميثان عند ١ س هيدروجينى ٨ مع حمض الهيدركلوريك ٦ عيارى
- كمية مناسبة من إنزيم بنكرياتيك ليباز
- أسيتون
- شرائح سليكا جيل ٦٠ لجهاز الكروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة .
- مذيب مظهر يحضر كما يلى :

ان (n) - هكسان أو بتروليم الخفيف (٣٠ - ٦٠ ° س) ٧٠ مليلتر

- ثنائى اثيل ايثر ٣٠ مليلتر
- حمض الفورميك ٩٨ ٪ (حجم/ حجم) ١ مليلتر
- محلول ٧,٢ ثنائى كلوروفلورسين يستخدم ككشاف ٢ حم/ لتر فى ٩٥ ٪ (حم/ حم) إيثانول ويضاف هيدروكسيد صوديوم ١ عيارى/ ١٠٠ مليلتر من المحلول حتى يكون قلوياً هيدروكسيد صوديوم ، محلول ميثنوليك

٠,٥ عيارى يذاب فى ٢ جرام هيدروكسيد صوديوم فى ١٠٠ مليلتر ميثانول لا يحتوى على أكثر من ٠,٥ ٪ (مليلتر/مليلتر) من الماء .

- ثلاثى فلوريد البورون ، محلول ميثانوليك (٢٠ ٪ مليلتر/مليلتر)
- هيبتان لتدريج الكروماتوجراف .
- محلول مائى مشبع من كلوريد الصوديوم .
- أحمر الميثايل ١ جرام/لتر محلول فى ٦٠ ٪ إيثنول (جم/جم) .
- خليط من استرات الميثيل من الأحماض الدهنية أو استرات المثيل من الزيوت المعروف تركيبها .

الأجهزة والأدوات :

١ - خلاط كهربائى .
٢ - عمود زاجى لجهاز الكروماتوجرف قطره الداخلى ١٢ مليمتر وطوله ٤٠٠ مليمتر .
٣ - جهاز تبخير للمياه .
٤ - قمع فصل سعته ٥٠ مليلتر .
٥ - قوارير مخروطية سعة ٢٥٠ ، ٥٠٠ مليلتر .
٦ - أقماع .
٧ - ورق ترشيح .
٨ - قوارير ذات قاع مستدير سعة ٥٠ ، ١٠٠ مليلتر .
٩ - جهاز طرد مركزى .
١٠- أنابيب جهاز طرد مركزى سعة ١٠ مليلتر .

١١- حمام مائى مزود بترمومتر أتوماتيكى القراءة حتى درجة ٤٠° س ± ٥° س .

١٢- هزاز كهربائى .

١٣- ساعة إيقاف .

١٤- محقن أو ماصات باستير مثبت فيها حلمة جلدية .

١٥- شرائح زجاجية لجهاز الكروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة ٢٠ × ٢٠ س.

١٦- حامل للشرائح .

١٧- وعاء زجاجى كبير .

١٨- محقن تحت الجلد (محقن الزرق) سعتها ١ مليلتر مزودة بإبرة رفيعة أو بأنبوبة شعرية .

١٩- لمبة أشعة فوق البنفسجية لفحص شرائح جهاز كروماتوجراف الطبقة الرقيقة .

٢٠- ملوق (ملعقة أو سكين) صغير .

٢١- فرن ذات درجة حرارة ١٥٣° + ٢° س .

٢٢- مجفف .

٢٣- مكثف عاكس ٢٠ - ٣٠ سم كمثبت به قارورة ذت قاع مستدير .

٢٤- كرات صغيرة من الزجاج .

٢٥- غطاء حرارى .

٢٦- ماصات مدرجة مختلفة الأحجام مثبت بها حلمات جلدية .

٢٧- أنابيب اختبار مختلفة الأحجام .

٢٨- ميكرومحاقن .

٢٩- جهاز الكروماتوجراف الغازى .

٣٠- ثلاجة .

طريقة العمل :

تحضير عينة الاختبار :

استخلاص الدهن :

يوزن من ١٠ - ٥٠ جرام من العينة وتوضع على ١٠٠ مليلتر من الميثانول فى الخلاط وتخلط جيداً لمدة دقيقتين ثم يضاف ٥٠ مليلتر هكسان أو بتروليم ايثر (٣٠ - ٦٠ ْس) و ٥٠ مليلتر ثنائى إيثيل ايثر ثم يخلط جيداً لمدة ٥ دقائق . ثم ينقل المستخلص دخل قمع الفصل . بقايا المستخلص يوضع عليها ٥٠ مليلتر من خليط الهكسات وثنائى إيثيل ايثر (١ : ١) تكرر ثلاث مرات ثم يوضع المستخلص فى قمع الفصل.

يضاف ماء مقطر إلى قمع الفصل ويرج بلطف ثم ينتظر حتى تتكون طبقتين واضحتين تنقل الطبقة الموجودة بالقاع وتغسل الطبقة العليا ثلاث مرات بالماء المقطر ثم ينقل المستخلص فى قارورة مخروطية سعة ٥٠٠ مليلتر ثم يضاف كبريتات الصوديوم اللامائية رج جيداً ثم تترك القارورة ١٠ دقائق ثم يرشح وينقل المذيب من الراشح باستعمال جهاز التبخير تحت ضغط منخفض عند درجة حرارة ٤٠ ْس . المستخلص يستعمل فى تحليلات عديدة .

ملحوظة : إذا كانت العينة زيت أو دهن لا تحتاج إلى ستخلاص ومباشرة تستخدم كما هو فى خطوة رقم ٢ .

٢ - تعيين حموضة العينة :

تعيين حموضة عينة الاختبار تبعاً للمواصفة السعودية رقم ٣٠ عام ١٣٩٧ هـ . إذا كانت الحامضية أقل من ٣ ٪ تنقى العينة كما فى الخطوة القادمة رقم ٤ . إذا كانت الحموضة أعلى من ٣ ٪ أولاً تعادل العينة بهيدروكسيد الصوديوم

فى وجود المذيب كما هو فى الخطوة رقم ٣ ثم تـنقى من خلال اليومنيا كما هو فى الخطوة رقم ٤ .

٣ - يعادل بهيدروكسيد الصوديوم :

يذاب حوالى ١٠ جرام من عينة الاخـتبار كما فى الخطوة رقم ١ فى ١٠٠ مليلتر مـن الهكسان أو البتروليم الخـفيف ثم ينقل المحلول إلى قـمع الفصل . يضاف ٥٠ مليلتر من الإيثانول ٩٥ ٪ حجم/ حجم ، وقليل من النقط لمحلول فينوفـثالين وحجم هيـدروكسيد الصوديـوم يكافئ الحامض الحـر من الدهن أو الزيت بزيادة عن ٠,٥ ٪ . يرج جيداً لمدة دقيقة واحدة ويضاف ٥٠ مليلتر ماء مقطر ثم يرج مرة أخرى واترك المحلول حتى يـتكون طبقتين واضحتين . تنقل الطبقة الموجودة فى القـاع . تغسـل الطبقة العليا للزيت المعـادل بالتتابع بحوالى ٢٥ أو ٣٠ مليـلتر من مـحلول الإيثانـول حتى يختـفى اللون الـوردى الأحمر للفينول فيثالين . ثم ينقل المحلول فى قارورة مخروطية الشكل ويضاف كبريتات الصوديوم ويرج جيداً ثم تترك على الحامل لمدة ١٠ دقائق . ثم يرشح المحلول وتغسـل القارورة بالهكسـان (٥٠ مليلـتر) ثلاث مرات ثم يرشح الغسيل . تغسل ورقة الترشيح بالهكسـان ويـنقل الراشح داخل قـارورة التبخير . ينـقل المذيب كاملاً عند درجة حرارة ٤٠° س تحت ضغط منخفض .

٤ - تنقية حضن الاختبار خلال اليومينا :

يحـضر محلول معـلق من ١٥ جرام من اليـومينا النشـطة فى ٥٠ مليـلتر هكسان ويصب مع التقليب داخل عمود الكـروماتوجراف تترك الأليومينا تستقر حتى ينقص مـستوى المذيب ١ - ٢ مليمـتر فوق المكثف . بعنـاية يصب داخل العمـود محلول من ٥ جـرام من الزيت فى ٢٥ ملـيلتر من الهكســان يجمع كل السائل المزاح من الـعمود فى قارورة ذات قاع مستدير وسعتها ١٠٠ مليلتر ينقل

المذيب كاملاً عند درجة حرارة ٤٠ ° س تحت ضغط منخفض فى جهاز التبخير الدوار .

٥ - التحليل المائى الانزيمى للجليسريدات الثلاثية :

يوزن ١, ٠ جرام من حضن الاختبار النقية كما فى الخطوة رقم ٤ وتوضع فى أنبوبة جهاز طرد مركزى . إذا كانت العينة زيت تستخدم مباشرة أما إذا كانت صلبة الدهن لابد من إذابته فى ٢, مليلتر من الهكسان مع تسخين لطيف إذا تطلب الأمر .

يضاف ٢٠ مليجرام من إنزيم ليباز و ٢ مليلتر من المحلول المحايد . رج بعناية ثم يضاف ٥, ٠ مليلتر من محلول شولات الصوديوم . يدخل الغطاء ويرج بعناية ثم توضع لأنبوبة مباشرة فى حمام مائى درجة حرارته ٤٠ ° س + ٥ ° س . ثم يرج باليد لمدة دقيقة ثم تنقل من الحمام المائى وترج بقوة على جهاز الهز الكهربى لمدة دقيقتين بالضبط . ثم تبرد مباشرة بغمس الأنبوبة فى الماء . يضاف ١ مليلتر من حمض الهيدروكلوريك ويضف ١ مليلتر من ثنائى ايثل إيثر ثم يدخل الغطاء ويرج بقوة بواسطة جهاز الهز الكهربائى . ثم تدور فى جهاز الطرد المركزى . ويستعمل الطبقة العليا مباشرة فى فصل ٢ - الجليسريدات الأحادية بواسطة جهاز كروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة : كما هو فى الخطوة رقم ٦/ ٢ .

٦ - فصل ٢ - الجليسريدات الاحادية :

١ - تجهيز الشرائح :

تنظف الشرائح الزجاجية بالإيثانول والهكسان والأسيتون لإزالة المواد الدهنية تماماً يوزن ٣٠ جرام من السليكا جل وتوضع داخل قارورة مخروطية

سعة ٢٥٠ مليلتر ويضاف ٦٠ مليلتر من الماء المقطر ثم تغطى القارورة وترج بقوة لمدة دقيقة ينقل المحلول مباشرة إلى الناشره وتنشر طبقة سمكها ٠,٢٥ مليمتر على شرائح نظيفة . تترك الشرائح حتى تجف لمدة ١٥ دقيقة فى الهواء ثم بعد ذلك لمدة ساعة فى الفرن عند درجة حرارة ١٠٣ + ٢ ° س . تبرد الشرائح فى مجفف فى درجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال .

٢ - فصل ٢ - الجليسريدات الاحادية بجهاز كروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة :

يوضع المستخلص على شريحة جهاز الكروماتوجراف بالميكرومحقن أو بأنبوبة شعرية حوالى ١,٥ سم من حرف القاع كخط رفيع ثم توضع الشريحة فى حوض به المذيب المظهر المشبع عند درجة حرارة ٢٠ ° س حتى مقدمة المذيب تصل حوالى ١ سم من الحرف العلوى تجفف الشريحة فى الهواء عند درجة حرارة ٢٠ ° س وترش بمحلول ٢,٧ - ثنائى كلوروفلورسين ، علم حزمه الجليسريدات الأحادية تحت ضوء الأشعة فوق بنفسجية وتكشط باستخدام الملعقة أو السكين الصغيرة متجنباً إزالة المركب المكون الباقى على بداية الخط .

تجهيز وتحليل استرات الميثيل للجليسريدات الثلاثية :

٢ - الجليسريدات الاحادية :

يجهز إسترات الميثيل من الجليسريدات الثلاثية و ٢ - الجليسريدات الأحادية تبعاً للأيزو ٥٥٠٩ كما يأتى :

١ - التصبن والتاستر :

يدخل حوالى ١, جرام من الجليسريدات الثلاثية النقية من عينة الاختبار فى قارورة سعتها ٥٠ مليلتر ويضاف ٤ مليلتر من محلول ميثانوليك هيدروكسيد الصوديوم كما هو مبين فى جدول (١) .

جدول (١)

الكمية المناسبة من الكواشف وحجم القارورة وعلاقتها بحجم عينة الاختبار

عينة الاختبار	قارورة	محلول هيدروكسيد صوديوم	محلول ثلاثى فلوريد البورون	هبتان
مليجرام	مليلتر	مليلتر	مليلتر	مليلتر
- ٢٥٠	٥٠	٤	٥	١ - ٣
- ٥٠٠	٥٠	٦	٧	٢ - ٥
- ٧٥٠	١٠٠	٨	٩	٤ -٨
- ١٠٠٠	١٠٠	١٠	١٢	٧ - ١٠

فى حالة ٢ - الجليسريدات الأحادية يضاف السيليكا جل المجمعة أو مستخلص الجليسريدات الأحادية من السيليكا جل مباشرة دخل قارورة سعتها ٥٠ مليلتر .

يضاف كرات الزجاج إلى القارورة ودور الكثف ومرر الماء البارد عند درجة حرارة ١٥ ° س خلال المكثف باستخدام دورة الماء المثلج . ثم يغلى تحت العاكس لمدة ١٠ دقائق حتى تختفى قطرات الدهن . يضاف ٥ مليلتر من ميثانوليك ثلاثى فلوريد البورون بواسطة ماصة مدرجة إلى السائل المغلى ويستمر الغلى لمدة دقيقتين . يضاف كمية من الهبتان جدول (١) ويستمر فى الغلى لمدة دقيقة . يوقف التسخين ويبرد عند درجة حرارة الحجرة ثم بعد ذلك. تبعد القارورة . يضاف جزء بسيط من المحلول المركز لكلوريد الصوديوم وترج القارورة بلطف عدة مرات .

يضاف أكثر من محلول كلوريد الصوديوم المركز حتى يصل مستوى السائل حتى رقبة القارورة .

تنقل طبقة الهبتان بماصة باستير إلى أنبوبة اختبار . يضاف كبريتات الصوديوم اللامائية ثم يرج . وتترك لمدة ٥ دقائق وتنقل داخل قوارير صغيرة سعة كل منها ٤ مليلتر ومثبت عليها غطاء من التفلون .

تحليل استرات الميثيل بجهاز الكروماتوجراف السائل الغازى :

من أجل تحليل استرات الميثيل يجب ملاحظة ما يأتى :

١ - درجة حرارة عمود جهاز الكروماتوجراف السائل الغازى .
٧٠° س - ٣ دقيقة - ٢٠° س / دقيقة - ١٥٠° س - ٢ دقيقة - ٢٥° س لكل دقيقة - ٢٠٠° س - ١٥ دقيقة .

٢ - المحقن - ٢١٠° س .

٣ - الكشاف - ٢٢٠° س .

٤ - حامل الغاز - نيتروجين .

٥ - درجة أنسياب حامل الغاز - ٢٠ مليلتر / الدقيقة .

٩ - التحليل الكيفى :

- يحلل المرجع القياس من خليط استرات الميثيل من الأحماض الدهنية ك$_{٤}$ - ك$_{٢٤}$ بحقن كمية محددة (١, ٠ - ٢, ٠ ميكرولتر) تحت الظروف السابق ذكرها فى بند ٨ . ثم أحقن العينة (١ ميكرولتر) كما تم الحصول عليها فى بند ٧ ويلاحظ تعين القمة بالمقارنة بوقت الاحتباس للمحلول القياسى لأسترات الميثيل وقت الاحتباس لمختلف استرات الميثيل مبين فى الجدول رقم ٢ .

جدول رقم (٢)

أوقات الاحتباس لإسترات الميثيل للأحماض الدهنية

استر ميثيل حمض الدهن	وقت الاحتباس
ك٤	١,١٨
ك٦	٢,٩٨
ك٨	٥,٢٦
ك٩	٥,٩٩
ك١٠	٦,٦٤
ك١١	٧,٢٢
ك١٢	٧,٦
ك١٣	٨,٦٧
ك١٤	٩,٦٥
ك١٥	١٠,٤٣
ك١٦	١١,٠١
ك١٦ : ١	١١,٣١
ك١٧	١١,٥٤
ك١٨	١٢,١٠
ك١٨ : ١	١٢,٤١
ك١٨ : ٢	١٣,٠٢
ك١٨ : ٣	١٣,٥٨
ك٢٠	١٣,٩١
ك٢٠ : ١	١٤,٠٨
ك٢٢ : ١	١٦,٧٧
ك٢٤ : ١	٢١,١٥

١٠- التحليل الكمى :

جميع عناصر العينة تمثل على الكروماتوجرام وكل المساحة الموجودة تحت القمة تمثل ١٠٠ ٪ من عناصر العينة .

ويعرف الجهاز بمعطيات البيانات حتى يمنع قمة المذيب من الدخول فى الحسابات . ويحقن الجهاز بحجم مناسب (١ , - ٢ ميكر لتر) من محلول المخلوط من أسترات الميثيل للأحماض الدهنية . وتحليل النتائج لابد وأن يكون مماثل للمكونات القياسية .

تحقن استرات الميثيل من الجليسريدات الثلاثية ، ٢ - الجليسريدات الأحادية للعينة كما هو مبين فى الخطوة رقم ٩ وتستخدم النتائج المتحصل عليها للمقارنة بالصور الجانبية لحمض الدهن وعلاوة على ذلك تستخدم فى الحسابات.

إذا كانت جرعة الكروماتوجراف لا تحتوى على الدامج الموحد ، تعين المساحة الموجودة تحت كل قمة بضرب ارتفاع القمة فى العرض عند وسط الارتفاع . عند الضرورة تؤخذ داخل الحسابات التخفيفات المختلفة التى تؤخذ أثناء التسجيل .

حساب نسبة كل قمة كما يأتى :

$$\text{النسبة بالكتلة لكل مركب كميثيل استر} = \frac{أ_{١}}{أ_{٢}} \times ١٠٠$$

$أ_{١}$ هى المساحة الموجودة تحت القمة المتطابقة مع المركب

$أ_{٢}$ هى حاصل جمع المساحات الموجودة تحت كل القمم

توضيح وصياغة النتائج :

يحسب معامل الإثراء لحمض البالمـتيك والنسب الأخرى لحمض الدهن من تركيب الجليسريدات الثلاثية ، ٢ - الجليسريدات الأحادية كما يأتى :

معامل الإثراء لحمض البالمتيك Polmitic acid enrichment factor

نسبة حمض البالمتيك ك$_{١٦}$: صفر فى ٢ - الجليسريدات الأحادية
____
نسبة حمض البالمتيك ك$_{١٦}$: صفر فى الجليسريدات الثلاثية

نسبة حمض البالمتيك ك$_{١٦}$: صفر فى ٢ - الجليسريدات الأحادية
____
نسبة حمض ميريستيك ك$_{١٤}$: صفر فى الجليسريدات الثلاثية

نسبة حمض أوليك ك$_{١٨}$: ١ فى الجليسريدات الأحادية
____
نسبة حمض أوليك ك$_{١٨}$: ١ فى ٢ - الجليسريدات الأحادية

بمقارنـة الصـورة الجانـبية Profile لحمـض الدهن ، قيـمة معامـل الإثراء لحمض البالمتيك ونسب حمض الدهن الأخـرى بتطابق الصورة الجانبية لحمض الدهن والنـسبة المتطابقة والمـماثلة للزيوت أو الـدهون النقية كما هـو مبين فى جدول ٣ ، ٤ .

جدول رقم ٣

معامل الإثراء لحمض البالمتيك ونسب الأحماض الدهنية الأخرى فى الدهون المختلفة

الزيت / الدهن	نسب الحمض الدهنى		
	١	٢	٣
دهن خنزير	٢,٧٠	٥,٠٠	٤,٢٠
دهن بقر	,٦٠	٣,٧٠	١,١٠
دهن غنم	,٧٠	٤,٦٠	٥,٨٠
دهن جمل	,٤٢	١,٦٤	٥,٢٣
دهن زبدة	١,٢٠	٣,٧٠	٢,٣٠
دهن فراخ	,٥٠	١٦,٠٠	,٧٤

الصور الجانبة Profile لمختلف حمض الدهن فى العينات من تتطابق الزيوت / الدهون النقية سوف تؤخذ وتغش بالدهون الغريبة . العينات ذات القيمة العالية فى معامل لإثراء enrichment ونسب حمض الدهن الأخرى سوف توصف أو تسجل كعينا مشتبه بتلوثها بدهن الخنزير .

المراجـــع العامـــة

المراجــع العامــة

المرجع العربية :

- القرآن الكريم .
- جامعة الدول العربية ١٩٧٢ «طريقة قياسـية لتميز دهن الخنزير فى الزيوت المهدرجة والدهون الحيوانية» المنظمة العربية للمواصفات والمقاييس .
- الهـيئة العربية السعودية للمـواصفات ولمقاييس ١٩٨٧ «الكشف عن دهون الخنزير فى الأغذية» .
- الكشف عن لحـوم ودهون الخنزير فى المنتـجات الغذائية للدكـتور/ محمد محمد محمد هاشم، الدار السعودية للنشر والتوزيع ٢٠٠٤.

المرجع الاجنبية :

- Abdel - Fattah. L. E. Detection and determination of pig fat in other animal fats M.sc. theris Faenlty of farnacy Cairo University, 1970.
- Abdel - Fattah. L. E. Analysis study of some food and parmaceutical lipids products ph. D. thesis Faculty of Pharmacy. Cairo University, 1974.
- Abo Eol Fattah, L. Sayed Ph. D. of pharmacy thesis (Analytical chemistry). Cairo University, 1974.
- Amer, M M, Abdel Kader S., Ahmad and Laila El Sayed procceding from the third Arab congeress, 1972.

- A. O. C. S., official and tentative Methods the american oil chemists society, 2 nd ed chicago III. Ionois, 1964.
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official Dgrianltural chemists, 12th ed. Washington, D. C., 1975.
- Atassi, M, Z, Th Complete antigenic strudure of myogobin : Approches and conculusions for antigenic structures of proteins ch. 3 in immuno chemistry of proteins, vol II, 1977.
- Barford, R. A., Luddy, EF., erb, S.F, Madidman, p. and Riemenschneider, Glycerid distribution in adipose and liver glycerides of animals. J Amer. oil cemists, Soc. 42, 1965.
- Brocherhoff, H., Hoyle, R. J. and Wolmark, N. Positional distribution of fatty acids in trigly cerides of animal depat fats. Biochem. Biopys. Acta, 116, 1966.
- Bruce, W., R. Pork lootest USDA protocal kit for Elisa detection of pork in cooked or canned mat products, ABC research laboratory manual, Gainesville, Florida, 1989.
- Carnegie, P. R., Ilic, M. Z., Etheridge, M.O., and collins, M. G., Improved high. performance liquid chromates graphic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carhosine and balenine present in Fresh meat, J. of chromatography, 261, 1983.
- Carnegie, P. R., Handbook of HPLC for the separation of amino acid, peptides and proteins, Vol. II, W. S. Hancock (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fbrida, 1983.

- Carnegie, P.R., Collino, M. G. and Ilic, M. Z., use of histidine dipeptides to estimate the proportion of pig meat in processed meats. Meat science, 10, 1984.
- Cattaneo, P., Blanchi, M., A, Beretta, G. and Cantoni, C. keeping characteristico of lamb and its nutritive value, Industeria, Alimentri, 18 (9), 1979.
- Cauglity, E. J. and Lehman, L. W., The preparation of Alkyl Esters from highly unsaturated trigly cerides, J. Am. oil chem. Soc. 42, 1963.
- Codex Alimentarius, Volume XI, part II, P. 149, Stem 28, 1981.
- Coleman, M. H., The pancreatic hydrolysis of natural fats. III The influence of the extent of hydrolysis on monoglycerides composition J. Am. oil chem. soc. 40, 1963.
- Cortecs diagnostics, Biokits, Cooked meat species identification kit, for the qualitative detection of species content in cooked meats, meat products and animal feeds by enzyme immuno assay, U. K., 1993.
- Cortecs diagnostics, Biokits, Meat species Identification for the quantitative ditection of pork content in uncooked meat and meat products by enzyme immuno assay (High Sensitivity), U.K, 1994.
- Dashlouty, A.A. Studies on the quality some meat products, thesis, Foeulty of Agric. Ain shans university 1978.

- Dattillo, M. and congiu F., Separation of soluble proteines of lambs and kids of different agea, by means of isoelective focusing, rivista dizootecny veterinaria No 159, 1978.
- Day, J. A. and Lumley, I. D., Detection and determinatio.n of pork in other fats. The laboratory of the Government chemist., corwall house, Waterloo, London, 1985.
- Distav, E., an Baur. F., The determination of mono - Gli. and triglyeeride concentration by columon chromatography J. Assoc. office, Agr. chemists. 48, 1965.
- El Dashlouty, A., Comparative studies on the canned beef and pork. J. fod Sa. g. No. 112 PP. 1-12, 1981.
- El mossalami, E., El Nawawi, F., Roushdy, S. and El afify Meat Hygiene and technology, Cairo University, Faculty Veternary medicine, 1995.
- El Sayed, L. and Dashlauty, A. The detection and determination of pork in canned meat and sausages, La rivista italiana delle sostanze grasse - vol. Lvi, 1979.
- Hamm, R, In : The physiology and biochemistup of muscle as a food, University of Wisconsin pross, Madison, 1966.
- Harris, H, and Hopkinson, D.A., Handbook of Enzyme Electrophoresis in human genatics North - Holland, 1976.

- Hayden, A. R., Detection of chicken flesh in beef susage, J. food Sci, 42, 1977.
- Hayden, A. R., Immunochemical determinatis of species of crigin of meat products. Ph. D thesis, University of Wisconsin, Madison, 1979 a.
- Heinert, H. H. and klinger, A. Specis - Specific protein differentiation. protien and enzyme patterns in roe deer & red deer, Die fleisch wirtschaft, 60, 1980.
- ISo, 6800, 1985 E.
- Janssen, F. W., Voortman, G, and De Baaÿ, J. Detation of weat gluten, whey proteine, casein, oralbumin and soy proteinin heated meat Unters, Forsch, 1987.
- Hanssen, F.W., Hagele, G.H., voorpostel, A.M.B., and de BAA J. A., Myoglobin analysis for determination of beef, pork, Horse, sheep, and kangaroo meat in blended cooked products, J. of food science, V. 55, No. 6, 1990.
- King, N. L. Species identification of cooked meats by Enzyme - staining of isoelectric focusing Gels, Csiro division of food research, meat research laboratory, Cennon Hill, Queensland, Australia, 1984.
- Mattson F.H, Volpenhein, R.A, and Lutton E.S., Patterns in the triglyceride structure of natural fats, fatte selfen anstrichmitiel 4, 1973.

- Nour El Din, H., Soluman, A., Ashour, F., and Bayoumi, A. chemical composition of pork anf matton in Egypt, Food tecnology Dep. Faculty of Agriclture Moushtoher, Zagazig university, 194.
- Olsman, W. J., Slump, P. Developments in meat Science - 2, Applied Science publised London, 1981.
- Pavlovski, P. E., and palmin, V. V., Biocenistup of mat and meat products. Food industrey pub. Moscow, 1963.
- Pearson, D., The cemical analysis of food, National college of ffod. Tech. Univ. of reading, weybeidge, surry. J. and A. chirch 1970.
- Prasad V., S. S. and Misra, D. S., Differentiation of meats of diffeerent species of animals by muscle esterase pattern in different age and sex groups. Indian J. Anim Sci 51, 1981.
- Ruaeaff, L., and Karleskind, Analysis of animal fat mixtures cooked meat products and derivatives, are free from pork fat,. department for research and analytical fermulation laboratives wolff - clichy, 1983.
- Slam, M., Hamed, O., Nahed, G. and Wafaa, W. Zoonses, Cairo University, Fuculty of veteriuary medicine, Hygiene, Hasbandry and zoonos Department 1995.
- Sokolov, A. A., Physico - cemical ands biochemical basis of meat products technology. food industry pub., Moscow, 1965.

- Stinson, C. G., Deman,J. M. and Bowland, J. P., Fotty acid composition and glyceride structure of piglet body fat from different sampling sites, J. Amer, oil chemists soc. 44, 1967.
- Thomas, A. E., scharaum, J. E., and Rolston, , Quantitative estimation of isomaric monoglyerides by thin layer chromatography, J. Am, oil chem, soc. 42, 1965.
- Tuna, N. and Mangold, H. K. Evaluation of the areleriorclerotie plaque, the university of chicago, 1965.
- Williams S. K. A., oil fats and fatty acids. Their practical examination faurth Edition J. and A chuschill LTD London, 1966.

الفهـــرس

الموضــــوع **الصفحة**

الموضــــوع | الصفحة